

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	4
1.1. RÉSZLETES CÉLKITŰZÉSEK.....	7
1.1.1. <i>Búza × árpa hibridizáció.....</i>	7
1.1.2. <i>Idegen fajú génátvitel a rozsból a búzába.....</i>	8
1.1.3. <i>Búza × Aegilops biuncialis hibridek, addíciók előállítása.....</i>	8
2. IRODALOM.....	9
2.1. IDEGEN FAJÚ GÉNÁTVITEL A BÚZÁBA.....	9
2.1.1. <i>Faj- és nemzetségkeresztezések története, főbb gyakorlati eredményei.....</i>	9
2.1.2. <i>Az idegen fajú génátvitel különböző módszerei</i>	9
2.2. BÚZA × ÁRPA HIBRIDEK ELŐÁLLÍTÁSA, BÚZA/ÁRPA ADDÍCIÓS VONALAK ÉS TRANZLOKÁCIÓK LÉTREHOZÁSA.....	14
2.2.1. <i>Búza × árpa hibridek előállítása.....</i>	14
2.2.2. <i>Más Hordeum fajokkal előállított hibridek.....</i>	16
2.2.3. <i>A búza × árpa hibridek in vitro szaporítása.....</i>	18
2.2.4. <i>A kromoszómák párosodása a búza × árpa hibridekben</i>	19
2.2.5. <i>Búza/árpa rekombinációk, transzlokációk előállítása.....</i>	21
2.3. IDEGEN FAJÚ GÉNÁTVITEL A ROZSBÓL A BÚZÁBA.....	22
2.3.1. <i>Búza × rozs hibridek, tritikálé előállítása.....</i>	22
2.3.2. <i>Búza/rozs addíciós vonalak</i>	23
2.3.3. <i>Búza/rozs szubsztitúciós vonalak.....</i>	24
2.3.4. <i>Búza/rozs transzlokációk előállítása, az 1BL.1RS transzlokáció elterjedése a termesztett búzafajtákban.....</i>	25
2.4. GÉNÁTVITEL AEGILOPS FAJOKBÓL A BÚZÁBA.....	27
2.4.1. <i>Búza × Aegilops hibridek előállítása.....</i>	27
2.4.2. <i>Búza/Aegilops addíciós, szubsztitúciós vonalak.....</i>	29
2.4.3. <i>Búza/Aegilops transzlokációk.....</i>	30
2.4.4. <i>Az Aegilops biuncialis Vis.....</i>	32
2.5. KROMOSZÓMA AZONOSÍTÁS A HIBRIDEKBEN ÉS SZÁRMAZÉKAIKBAN MOLEKULÁRIS CITOGENETIKAI ÉS GENETIKAI MÓDSZEREKKEL.....	33
2.5.1. <i>Kromoszómák azonosítása sávozással, Giemsa festés.....</i>	33

2.5.2. <i>In situ</i> hibridizáció.....	35
2.5.3. Molekuláris markerek felhasználása az idegen fajú kromoszómák azonosítására	37
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	39
3.1. ANYAGOK.....	39
3.1.1. Növényi anyagok	39
3.2. MÓDSZEREK.....	40
3.2.1. Növénynevelés, megporzások, embriókultúra és <i>in vitro</i> szaporítás.....	40
3.2.2. Citológiai vizsgálatok (Feulgen módszer és <i>in situ</i> hibridizáció).....	43
3.2.3. DNS izolálás.....	48
3.2.4. Mikroszatellit markerek vizsgálata.....	49
3.2.5. Statisztikai analízis.....	50
3.2.6. Rövidítések.....	50
4. EREDMÉNYEK.....	52
4. 1. BÚZA × ÁRPA HIBRIDIZÁCIÓ.....	52
4.1.1. Új őszi búza × őszi árpa hibridek előállítása.....	52
4.1.2. A hibridek elszaporítása szövettanban.....	55
4.1.3. A kromoszóma-párosodások vizsgálata a hibridekben	56
4.1.4. Új búza/árpa addíciós vonalak előállítása.....	63
4.1.5. Búza/árpa transzlokációs vonalak létrehozása	83
4.2. BÚZA × ROZS HIBRIDEK, AMFIDIPLOIDOK, REKOMBINÁNSOK ELŐÁLLÍTÁSA.....	98
4.2.1. Búza × rozs hibridek, amfidiploidok létrehozása.....	98
4.2.2. Rozs kromoszómák kimutatása GISH-sel.....	100
4.2.3. Búza/rozs rekombinánsok előállítása.....	101
4.3. BÚZA × AEGILOPS BIUNCIALIS HIBRIDEK, ADDÍCIÓK	106
4.3.1. Búza × <i>Aegilops biuncialis</i> hibridek, amfidiploidok előállítása.....	106
4.3.2. Búza/ <i>Aegilops biuncialis</i> addíciós vonalak azonosítása FISH-sel.....	108
4.3.3. Búza/ <i>Aegilops biuncialis</i> addíciós vonalak morfológiai jellemzői.....	112
5. MEGVITATÁS.....	115
5.1. BÚZA × ÁRPA HIBRIDIZÁCIÓ.....	115
5.2. BÚZA × ROZS HIBRIDEK, AMFIDIPLOIDOK, REKOMBINÁNSOK ELŐÁLLÍTÁSA.....	126
5.3. BÚZA × AEGILOPS BIUNCIALIS HIBRIDEK, AMFIDIPLOIDOK, ADDÍCIÓS VONALAK LÉTREHOZÁSA.....	129
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	132

<u>6. 1. BÚZA × ÁRPA HIBRIDIZÁCIÓ.....</u>	<u>132</u>
<u>6.2. BÚZA × ROZS HIBRIDEK ÉS REKOMBINÁNSOK ELŐÁLLÍTÁSA.....</u>	<u>135</u>
<u>6.3. BÚZA × AEGILOPS BIUNCIALIS HIBRIDEK, AMFIDIPLOIDOK, ADDÍCIÓK LÉTREHOZÁSA.....</u>	<u>136</u>
<u>7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</u>	<u>138</u>
<u>8. KÖVETKEZTETÉSEK.....</u>	<u>140</u>
<u>9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</u>	<u>144</u>
<u>10. IRODALOMJEGYZÉK.....</u>	<u>145</u>

1. BEVEZETÉS

A különböző fajok keresztezése, a kedvező tulajdonságoknak egy új fajban való ötvözése több száz éve foglalkoztatja a biológusokat, így már a XVII. században is beszámoltak különböző növényfajok közt előállított hibridekről. A XX. század első felében sikerült kialakítani olyan módszereket, elsősorban a hagyományos kromoszómafestési eljárások (Feulgen) kidolgozása után, amelyek már lehetővé tették a létrehozott hibridek, majd az utódok pontos citogenetikai elemzését, kromoszómaszámuk meghatározását. A meiózisban végzett kromoszóma-párosodások elemzésével a különböző fajok közti rokonsági viszonyok is tisztázhatók lettek. Módszert dolgoztak ki a hibridekből a már csak egy idegen fajú kromoszómapárt tartalmazó diszómás addíciós vonalak előállítására, amelyek citológiaiailag stabil, fertilis származékok lettek. Ezek a vonalak megfelelő kiindulási anyagok voltak ahhoz, hogy abból az idegen fajú kromoszómának csak egy szegmentumát, lehetőleg a hasznos idegen gént tartalmazó kromoszómaszakaszt építsék be a termesztett fajba. Ezeknek a módszereknek a felhasználásával az 50-es években állították elő az első idegen fajú transzlokációkat, melyek nyomán később számos új átépülésről is beszámoltak.

A különböző fajok és nemzetségek keresztezése a 70-es évektől kezdődően, a biotechnológiai módszerek fejlődésével új lendületet vett. A virágok hormonkezelésével, az embriókultúra felhasználásával számos olyan új hibridet lehetett létrehozni, amelyeket korábban megvalósíthatatlannak véltek. A 80-as években a Giemsa technika alkalmazásával megoldották a kromoszómák azonosítását, így ezzel a módszerrel ezután sok idegen fajú hibridet, addíciót, szubsztitúciót és transzlokációt elemeztek. A 90-es évektől a molekuláris citogenetikai módszerek (*in situ* hibridizáció) alkalmazása, majd a molekuláris markerek széleskörű használata révén a termesztett fajokba beépült idegen fajú kromoszóma-szegmentum azonosítása még pontosabbá, egyértelműbbé vált, ezáltal több korábban előállított genetikai anyag elemzését is elvégezték.

A termesztett fajokkal szoros rokonsági kapcsolatban álló vad fajok fontos génforrást jelentenek a termesztés számára, hiszen ezeket a fajokat az ember sosem nemesítette, így természetes változékonyságuk fennmaradt. Az utóbbi évtizedekben intenzív gyűjtőmunka folyt a vad fajok különböző származási területein azzal a céllal, hogy minél több változatukat felkutassák, és génbankokban megőrizték. A génbankokban tárolt genetikai anyagok agronómiai tulajdonságainak elemzését a kutatók folyamatosan végzik, elsősorban a biotikus

és az abiotikus stresszrezisztencia szempontjából és ennek eredményét a szakértők számára elérhetővé teszik.

A hexaploid búza rokonsági körébe tartozó termesztett és vad fajok széles genetikai diverzitással rendelkeznek számos fontos agronómiai tulajdonság tekintetében. A kecskebúza (*Aegilops*) és a tarackbúza fajok többsége (*Agropyron*, szinonima: *Thinopyrum*, illetve *Elytrigia*) abiotikus és biotikus stresszekkel szemben ellenálló, de az egyes fajokon belül is nagy változatosság figyelhető meg. Ezeknek a fajoknak számos vonala természetes élőhelyeiken máig megtalálható, illetve a világ különböző génbankjaiban elérhető, de többségük máig kiaknázatlan. Az *Aegilops* és *Agropyron* fajok a búzával ivaros úton keresztezhetők, és a kedvező tulajdonságok a hibridekből további visszakeresztezésekkel a termesztett búzába beépíthetők, így a nemesítés számára jelentős géntartalékokat jelentenek.

A búza termesztett rokonai közt is találunk olyan fajokat, amelyek a búzával ivaros úton keresztezhetők és olyan hasznos agronómiai tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek nem lelhetők fel a *Triticum aestivum* L. fajon belül. A rozs (*Secale cereale* L.) a búzánál betegségekkel [levélrozsda - *Puccinia tritica* Erikss., szinonima: *P. recondita* Rob. Ex Desmaz; szárrozsda - *Puccinia graminis* Pers.; sárgarozsda – *Puccinia striiformis* Westend.; lisztharmat – *Blumeria graminis* (DC) Speer, szin.: *Erysiphe graminis* DC.] szemben ellenállóbb, illetve a termesztés körülményeivel, a talajjal szemben igénytelenebb. Az árpa (*Hordeum vulgare* L.), a másik fontos termesztett gabonafélének, számos értékes, a búzától eltérő tulajdonsággal bír. Az őszi árpa az őszi búzához általában egy héttel korábban aratható, ami a korai aszályos időszakban kedvezőbb szemfejlődést eredményezhet, másrészt munkaszervezési szempontból is nagy előnyt jelenthet. A minőségi paraméterek tekintetében fontos különbség, hogy bizonyos létfontosságú aminosavak (pl. lizin) az árpában nagyobb arányban fordulnak elő, ezért takarmányozási szempontból az árpa kedvezőbb összetételű. Egyes árpa genotípusok kiváló só- és szárazságtűrők.

Ismert, hogy a termesztett búzafajtákba beépített rezisztenciagének (levélrozsda, szárrozsda, lisztharmat) többsége rokon, többnyire vad fajokból ered, mégis ezek száma rendkívül csekély a létező rezisztens génforrások számához viszonyítva. Ennek alapján várható, hogy a rokon fajok genetikai tartalékainak kiaknázása a jövőben is folytatódni fog. A faj- és nemzetségkeresztezéssel előállított idegen fajú transzlokációk létrehozásának legnagyobb akadálya, hogy ezeknek az anyagoknak az előállítása általában évtizedekig tart. A hibrid előállítása után több éven keresztül végzett citológiai azonosítás szükséges a már csak egy idegen fajú kromoszómát hordozó addíciók kiválogatásához, majd ismét több éves munkával lehetséges a már csak egy kromoszómaszakaszt hordozó transzlokációk

létrehozása, azonosítása. Az általában hároméves pályázati ciklusokban a több éves, akár évtizedes munka után várható eredménnyel kecsesítő kutatásokra nehéz pályázati forrást találni. A felgyorsult publikációs kényszer sem segíti, hogy ilyen hosszadalmas kísérleti munkát igénylő területet válasszanak a kutatók, így egyre szűkül az ezen a területen működő csoportok köre, holott a búzanemesítés igényli az új genetikai források létrehozását.

A fajidegen génátvitel újabb módszere az izolált gének közvetlen transzformációja, amellyel ez a feladat egy lépésben megoldható. A géntranszformáció területén azonban jelenleg a szűk keresztmetszet a fontos agronómiai tulajdonságokért felelős izolált gének száma. Pillanatnyilag a géntechnológiával előállított alapanyagokkal szemben Európában, többek közt Magyarországon is társadalmi tiltakozás tapasztalható, ami idővel várhatóan változni fog. A géntranszformáció a hagyományos keresztezésekkel szemben szélesebb lehetőségeket nyújt, hiszen az ivaroson nem keresztezhető fajokból is lehetséges lesz a génátvitel. A szoros rokonsági viszonyban álló fajok közt az ivaros keresztezésekkel végzett génátvitel azonban továbbra is perspektivikusnak tűnik, mert ezzel a módszerrel a rokon fajok számos vonala kiaknázható, nem szükséges az átvinni kívánt gének izolálása, elegendő a kívánatos genotípusok kiválogatása.

Kísérleteinkben célul tűztük ki a búzával szoros rokonsági kapcsolatban álló fajok közül a termesztett árpából és a rozsból, továbbá a vad fajok közül az *Aegilops biuncialis*-ból történő génátvitelt a búzába. Az árpából annak koraiságát, só- és szárazságtűrését, kedvező minőségi paramétereit kívánjuk a búzába beépíteni. A rozsból elsősorban új, hatékony betegségrezisztencia gének (levélrozsa, szárrozsa, lisztharmat) átvitele a cél a termesztett búzafajtákba. Szeretnénk kiaknázni az *Ae. biuncialis* Vis. jó só- és szárazságtűrését, illetve betegség-ellenállóságát (levélrozsa, szárrozsa, lisztharmat). A génátvitel megvalósításának érdekében először hibrideket, amfidiploidokat, majd addíciós vonalakat hozunk létre. Az addíciós vonalak felhasználásával lehetővé válik, hogy a kedvező tulajdonságokért felelős gének kromoszómális lokalizációját meghatározzuk. Tervbe vettük továbbá rekombinánsok, transzlokációk előállítását, melyek az idegen fajnak már csak egy kromoszómaszakaszát hordozzák. Célunk, hogy a hibridekben és utódaikban az idegen fajú kromoszómákat és kromoszóma-szegmentumokat a legkorszerűbb molekuláris citogenetikai módszerekkel mutassuk ki.

1.1. Részletes célkitűzések

1.1.1. Búza × árpa hibridizáció

1.1.1.1. Új őszi búza × őszi árpa hibridek előállítása, amelyek genetikailag lényegesen különböznek a korábban Ausztráliában a Chinese Spring kínai tavaszi búza és a Betzes német tavaszi árpa, genetikai modell fajtákból létrehozott hibridtől. A Martonvásári 9 kr1 búzatörzs felhasználásával hibrid létrehozása, amely lehetővé teszi, hogy az árpa kromoszómát, génkomplexumot a magyarországi éghajlati viszonyokhoz jól adaptálódott genotípusba építsük be.

1.1.1.2. A hibridek *in vitro* szaporítása, a visszakeresztezésekhez nagyszámú növény előállítása.

1.1.1.3. A hibridek és az azokból *in vitro* regenerált utódok részletes elemzése molekuláris citogenetikai módszerekkel, majd később molekuláris markerekkel. A hibridek és utódaik kromoszómaszámának és összetételének pontos elemzése, azokban az árpa és a búza kromoszómák megkülönböztetése.

1.1.1.4. A búza × árpa hibridek és a regeneránsok meiózisének I. metafázisában a kromoszóma-párosodások pontos elemzése, annak megállapítása, hogy az árpa és a búza kromoszómák párosodnak-e, azaz lehetséges-e rekombinánsok előállítása ebben a kombinációban. A szövettenyészetben elszaporított hibridek meiózisének annak vizsgálata, hogy történtek-e átrendeződések, megváltozások a hosszú időn át tartó *in vitro* fázisban.

1.1.1.5. A hibridekből visszakeresztezésekkel fertilis addíciós vonalak előállítása, melyek a búza mellett már csak egy pár árpa kromoszómát tartalmaznak. Ezek a vonalak már fertilisek, citológiaiilag stabilak és alkalmasak az egyes árpa kromoszómák hatásának vizsgálatára, továbbá kiváló kiindulási alapanyagai transzlokációk előállításának az adott kromoszómából.

1.1.1.6. Az addíciós vonalakban az egyes kromoszómák azonosítása *in situ* hibridizációval, repetítív próbák segítségével és molekuláris markerekkel.

1.1.1.7. A hibridekből transzlokációs vonalak kiválogatása. A transzlokációs kromoszómákban a búza és az árpa kromoszóma-szegmentumok azonosítása *in situ* hibridizációval és molekuláris markerekkel.

1.1.1.8. A búza-árpa transzlokációs vonalak felhasználása az árpa kromoszómák fizikai térképezésére.

1.1.1.9. Az addicionált árpa kromoszómák és a beépült árpa kromoszóma-szegmentumok hatásának vizsgálata a különböző morfológiai és agronómiai tulajdonságokra.

1.1.2. Idegen fajú génátvitel a rozsból a búzába

1.1.2.1. A martonvásári búzafajták jelentős többségébe is beépült 1BL.1RS transzlokációban a Petkus rozs kromoszómakar kicserélése egy magyar rozsfajta, a Lovászpatonai 1RS karjára. Első lépésként az Mv9 kr1 búzatörzsből és a Lovászpatonai rozsból hibrid, majd oktoploid tritikálé előállítása.

1.1.2.2. Az oktoploid tritikálében a búza és a rozs kromoszómák azonosítása genomikus *in situ* hibridizációval (GISH).

1.1.2.3. Az Mv9 kr1 × Lovászpatonai oktoploid tritikálé megporzása egy 1BL.1RS transzlokációt hordozó búzafajtaival, az Mv Matadorral.

1.1.2.4. Az (Mv9 kr1 × Lovászpatonai) × Mv Matador hibrid meiózisában a kromoszóma-párosodások elemzése *in situ* hibridizációval. Az 1RS.1BL transzlokációs kromoszóma és a Lovászpatonai rozs kromoszómái közti párosodások kimutatása.

1.1.2.5. Az (Mv9 kr1 × Lovászpatonai) × Mv Matador hibridek öntermékenyített utódaiban a Petkus rozs és a Lovászpatonai rozs közt rekombinánsok kimutatása a szekalin mintázat alapján.

1.1.2.6. A rekombinánsok elszaporítása, majd morfológiai és agronómiai tulajdonságaik tanulmányozása.

1.1.3. Búza × *Aegilops biuncialis* hibridek, addíciók előállítása

1.1.3.1. Búza (Mv9 kr1) × *Aegilops biuncialis* hibridek, amfidiploidok előállítása.

1.1.3.2. Búza × *Ae. biuncialis* amfidiploidok búzával történő megporzásával monoszómás, majd diszómás addíciós vonalak előállítása. A visszakeresztezett nemzedékekben minden egyes növény kromoszómaszámának meghatározása. A kiválogatott 44 kromoszómaszámú növények kromoszóma-párosodásának vizsgálata Feulgen módszerrel.

1.1.3.3. Búza/*Ae. biuncialis* addíciós vonalakban az *Ae. biuncialis* kromoszómák azonosítása fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH), repetítív DNS próbák segítségével a búza genom mellett.

1.1.3.4. Búza/*Ae. biuncialis* addíciós vonalak morfológiai és agronómiai tulajdonságainak vizsgálata.

2. IRODALOM

2.1. Idegen fajú génátvitel a búzába

2.1.1. Faj- és nemzetségkereszteзések története, főbb gyakorlati eredményei

A különböző fajok keresztezése, ezáltal a meglévő fajok kedvező tulajdonságait ötvöző hibridek előállítása régóta foglalkoztatja a kutatókat. Már az 1700-as években beszámoltak különböző növényfajok közt végzett tudatos keresztezésekről, majd a gabonafélék körében az első fajhibrideket az 1800-as években állították elő (lásd Belea, 1986). Az első búza (*Triticum*) × tarackbúza (*Agropyron*) és búza (*Triticum*) × rozs (*Secale*) hibridek előállításáról Wilson számolt be 1876-ban. Sikeres próbálkozásainak hatására a későbbi évtizedekben intenzív kutatások kezdődtek mindkét kombinációban új hibridek előállításának céljával. A búza × rozs kereszteзések eredményeként ma már Magyarországon is kb. 150 ezer hektáron termesztik a tritikálét, amely a fajkereszteзésekből származó első szintetikus növényfaj (Kiss, 1968). Szintén ebből a kombinációból ered az 1RS.1BL búza-rozs transzlokáció, amely ma már több száz búzafajtában kimutatható, így a világ búzatermesztésében több millió hektáron jelen van (Bedő és mtsai, 1993). A búza × tarackbúza kereszteзések legszélesebb körben elterjedt eredménye az *Lr19* rozsdarezisztencia gén átvitele a termesztett búzába (Sharma és Knott, 1966), amely különböző országokban szintén számos búzafajtában kimutatható (Friebe és mtsai, 1996a). Hasznos rezisztenciagéneket vittek át a búzával szoros rokonságban álló *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. ssp. *timopheevii* és ssp. *armeniicum* (Jakubz.) van Slageren (szinonima ssp. *araraticum* Jakubz.) fajokból és számos *Aegilops* fajból (*Ae. umbellulata* Zhuk., *Ae. ventricosa* Tausch, *Ae. speltoides* Tausch, *Ae. longissima* Schwinf. & Muschl., *Ae. comosa* Sm. in Sibth. & Sm.) is a termesztett búzába (lásd Friebe és mtsai, 1996a).

2.1.2. Az idegen fajú génátvitel különböző módszerei

Az idegen fajú génátvitel a búzába kétféle módszerrel hajtható végre, hagyományos úton faj- és nemzetséghibridekből citogenetikai technikák alkalmazásával végzett kromoszóma manipulációval, vagy az utóbbi évtizedben kidolgozott közvetlen génátvitellel, genetikai transzformációval.

2.1.2.1. Kromoszóma manipuláció

A kromoszóma manipulációval végzett idegen fajú génátvitel első lépése faj- és nemzetséghibridek létrehozása. A búza a rokon fajok jelentős hányadával ivaroson keresztezhető. Búza-*Aegilops*, búza-rozs, búza-*Agropyron* hibridek megfelelő körülmények között elvégzett megporzásokkal létrehozhatók (Belea, 1986). Távolsági kombinációk esetében (pl. *Festuca-Lolium*, búza-árpa) célszerű az embriókultúra alkalmazása (Heszky, 1972 a,b; Shepherd és Islam, 1981; Molnár-Láng és Sutka, 1994).

A hibridekből búzával végzett visszakeresztezésekkel addíciós vonalak állíthatók elő, amelyek az idegen fajnak már csak egy pár kromoszómáját tartalmazzák (O'Mara, 1940). Búza-idegen fajú addíciós sorozatokat hoztak létre korábban számos kombinációban (búza-rozs, búza-árpa, búza-*Agropyron*, búza-*Aegilops* fajok) (Shepherd és Islam, 1988). A búza-idegen fajú addíciós vonalak kiváló kiindulási anyagai a további génátviteli munkáknak, ezekből a vonalakból idegen fajú szubsztitúciók, majd transzlokációk állíthatók elő (Gale és Miller, 1987).

A transzlokációk létrehozásának célja, hogy már csak az adott tulajdonságokért felelős génkomplexumokat vigyük át a búzába. Az idegen fajú transzlokációk létrehozásakor meghatározó jelentőségű, hogy az átvinni kívánt tulajdonság olyan fajban található-e meg, amely a búzával homológ genomot tartalmaz, vagy az egy homeológ genomon található meg. Búzával homológ genomot tartalmaznak a *Triticum monococcum* L. (AA), a *T. urartu* Tumanian ex Gandilyan (AA), a *T. monococcum* L. ssp. *aegilopoides* (Link) Thell. (szinonima: *T. boeoticum* Boiss.) (AA), a *T. turgidum* L. (AABB) vad és termesztett változatai és az *Aegilops tauschii* Coss. (szinonima *Ae. squarrosa*, DD). Az ezekkel a fajokkal létrehozott hibridekben a búza és a rokon faj homológ genomjai közt természetes homológ kromoszóma-párosodás folyamán végbemenő crossing over során létrejöhetnek rekombinációk. A búzával homológ genomokat tartalmazó fajokat a búza elsődleges génforrásának nevezzük (Friebe és mtsai, 1996a).

A búza másodlagos génforrásainak azokat a *Triticum* és *Aegilops* fajokat tekintjük, amelyeknek legalább egyik genomja homológ a búzával. Ide tartoznak a tetraploid *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. ssp. *timopheevii* és a ssp. *armeniicum* (Jakubz.) van Slageren fajok, továbbá a Sitopsis szekcióba tartozó S genommal rendelkező *Aegilops* fajok, amelyek a búza B genomjával mutatnak hasonlóságot. Ezekből a fajokból is már számos rezisztenciagént vittek át a búzába (Friebe és mtsai, 1996a).

A búza harmadlagos génforrásai körébe azok a fajok tartoznak, amelyek nem tartalmazzák a búzával homológ genomokat. Az ezekkel a fajokkal létrehozott hibridekben nem várható a búza és az idegen fajú kromoszómák között párosodás, majd rekombináció, ezért az ezekből a fajokból tervezett génátvitelhez más módszerek szükségesek.

2.1.2.2. Centrikus fúzió indukálása

A teljes kromoszómakarok átvitelét elősegíti, hogy meiózisban az univalensek centroméránál törnek, és a törött végek egyesülhetnek (Sears, 1952). A homeológ rekombinációk létrejöttének érdekében az idegen fajú addíciós vonalakat búza monoszómákkal keresztezik, és az utódok közül kiválogatják a $20 \text{ búza}^{\text{II}} + 1 \text{ búza}^{\text{I}} + 1 \text{ idegen}^{\text{I}}$ kromoszómát hordozó vonalakat, ahol várható a búza és az idegen fajú kromoszóma párosodása. A megfelelő monoszómák kiválogatásával irányítható, hogy mely kromoszómák között történjen átépülés. Lukaszewski (1993) vizsgálatai szerint ezzel a módszerrel nagy arányban állíthatók elő kompenzáló transzlokációk.

2.1.2.3. Homeológ párosodás indukciója

A búza 5B kromoszómáján található *Ph1* gén kiiktatásával, 5B monoszómákkal illetve *Ph* gént nem tartalmazó mutáns vonalak felhasználásával a homeológ kromoszómák között a párosodás indukálható, így a nem homológ kromoszómák között transzlokációk jöhetnek létre. Az 5B búzakromoszómán a *Ph1* gén hatását a nem homológ kromoszómák párosodására először Riley és munkatársai (1968) írták le. A termesztett búza hexaploid jellege miatt kialakult egy olyan mechanizmus, amely gátolta, hogy az egymással homeológ A, B és D genom kromoszómái meiózisban párosodjanak, azaz ez biztosította, hogy minden kromoszóma a saját homológ párjával alkosson bivalenst. Ennek a génnek a hiányában megfigyelték, hogy nagy arányban párosodtak a búza és a vele keresztezett idegen faj kromoszómái. Gyengébb hatású *Ph2* gént a búza 3D kromoszómáján is lokalizáltak (Sears, 1984). A Chinese Spring búzafajtából állítottak elő először *Ph* mutáns vonalat (Sears, 1977), amelyet vad fajokkal keresztezve a későbbiekben idegen fajú transzlokációkat hoztak létre. Az *Aegilops speltoides* Tausch [szinonima: *T. speltoides* (Tausch) Gren. ex K.Richt.] a búza *Ph* génjének hatását elnyomó, szupresszor *Ph¹* gént tartalmaz (Riley és mtsai, 1961). Később ezt a gént sikeresen vitték át a Chinese Spring búzafajtába és egy *Ph¹* gént hordozó, vad fajokkal nagyfokú kromoszóma-párosodást mutató búza vonalat állítottak elő Chen és

munkatársai (1994). Indukált homeológ párosodás révén vittek át sárgarozsda rezisztenciát az *Aegilops comosa*-ból (Riley és mtsai, 1968), levéltrozsa rezisztenciát az *Agropyron elongatum*-ból (Host.) Beauv. (Sears, 1973) és az *Aegilops speltoides*-ből (Dvorak, 1977) és szártrozsa rezisztenciát az *Ae. speltoides*-ből (Sears és Loegering, 1982). A homeológ párosodás útján létrejövő transzlokációk előnye, hogy ezáltal kompenzáló típusú átépülések jönnek létre, amelyekben az idegen fajból származó kromoszómaszakasz általában pótolja a búzából kieső kromoszóma-szegmentumot.

2.1.2.4. Transzlokációk létrehozása kromoszómatörések előidézésével

A búzával távolabbi rokonsági kapcsolatban álló fajok (*Secale*, *Agropyron*, *Hordeum*, *Haynaldia*) kromoszómái sokszor még a *Ph* gén hiányában sem párosodnak a búza kromoszómákkal, ezért az ezekből a fajokból történő génátvitel kiváltásához más módszerek szükségesek. A kromoszómák törését többféle úton is elérhetjük, röntgen sugárzással, kémiai mutagénnel, vagy akár szövettenyésztéssel is (Feldman, 1988; Jauhar és Chibbar, 1999). A létrejött tört végek ezután újraegyesülhetnek a búza kromoszóma-szegmentumaival. A módszer előnye, hogy viszonylag nagy gyakorisággal állíthatók így elő transzlokációk, elérhető, hogy egy kromoszómakarnál kisebb szakasz épüljön át, hátránya viszont, hogy legtöbbször nem kompenzáló típusú átépülések kialakulásához vezet. Röntgensugárzással először Searsnek sikerült (1956) az *Aegilops umbellulata* levéltrozsa rezisztenciáját átvinni a búzába. Később számos fontos rezisztenciagént vittek át rokon fajokból (*Agropyron elongatum*, *A. intermedium* (Host.) Beauv., *Secale cereale* L.) ezzel a módszerrel a búzába (Knott, 1961; Sharma és Knott, 1966; Wienhues, 1965; Driscoll és Jensen, 1964).

Az utóbbi évtizedekben megfigyelték, hogy a szövettenyésztésből regenerált növényekben különböző kromoszómaszám és szerkezetbeli megváltozások tapasztalhatók (Larkin és Scowcroft, 1981), amelyek felhasználhatók az intergenerikus hibridek kromoszóma manipulációjára (Fedak és Grainger, 1986). A szövettenyésztés felhasználásával sikerült az árpa sárga törpeség vírussal (BYDV) szembeni rezisztenciát átvinni a *Thinopyrum intermedium*-ból (szinonima: *A. intermedium*) Banks és munkatársainak (1995) a búzába. Különböző búza-árpa transzlokációkat állítottak elő Molnár-Láng és munkatársai (2000a) szövettenyésztésben regenerált búza-árpa hibridek utódaiban.

A kromoszómák törését különböző genetikai módszerekkel is kiválthatjuk. Endo (1988) megfigyelte, hogy búza/*Aegilops cylindrica* addíciós vonalak előállításánál az *Aegilops cylindrica* Host kromoszómák jelenléte a búza genomában átrendeződéseket és

deléciókat hoz létre. Későbbiek során azonosította, hogy a gametocid gén az *Ae. cylindrica* 2C kromoszómáján helyezkedik el (Endo, 1996). Különböző idegen fajú addíciós vonalakat az *Aegilops cylindrica* 2C kromoszómáját tartalmazó addíciós vonallal keresztezve számos új búza-árpa, búza-rozs transzlokációt hoztak létre (Schubert és mtsai, 1998; Friebe és mtsai, 2000a).

2.1.2.5. Közvetlen idegen fajú génátvitel, genetikai transzformáció

A hagyományos citogenetikai módszerek mellett az utóbbi évtizedekben olyan új módszereket dolgoztak ki, amelyek lehetővé teszik, hogy az idegen fajokból átvinni kívánt tulajdonságokért felelős géneket izoláljuk, majd közvetlenül bejuttassuk a növényekbe (Dudits és Heszy, 2003). A módszer előnye, hogy csak a kívánt tulajdonságért felelős gén épül be a növényekbe és a génátvitel egy lépésben megvalósítható, nem szükséges számos generációt felnevelni, válogatni, mint a hagyományos módszerekkel (Balázs és Dudits, 1999). Annak ellenére, hogy a genetikai transzformáció több tekintetben feltétlenül előnyösebb mint a klasszikus módszer, mégsem mondhatjuk, hogy olyan gyorsasággal és mértékben elterjedt, mint az korábban várható volt. Számos növényfajból már világszerte több millió hektáron természetnek transzgénikus növényeket, a búza transzformálása viszont még ma sem vált rutinná. A transzgénikus növények elterjedésének Európában ma az egyik legnagyobb akadálya a lakossági tiltakozás a génmódosított (géntechnológiával előállított) növényekkel szemben. A módszer ma már kidolgozott (génagyúval illetve *Agrobacterium*-mal végzett transzformáció) (Pauk és mtsai, 1998, 2003), mégis számos kérdés vetődik fel. Nem irányítható pontosan a gén beépülésének helye, példányszáma. Nem ismert teljes mértékben, hogy a bejuttatott gén hogyan működik, illetve miért nem működik esetleg egy-két generációval később. Agronómiailag fontos tulajdonságokat meghatározó géneket a búzából még különösen keveset izoláltak, így korlátozott a megfelelő tulajdonságokért felelős, elérhető hasznos izolált gének száma. A felvetett kérdések miatt a géntechnológiai kutatásokkal párhuzamosan ma is indokolt a több száz éves múltra visszatekintő faj- és nemzetségkeresztezések folytatása, természetesen a legutóbbi molekuláris genetikai és citogenetikai technikákkal kombinálva, hiszen a búzával ivaroson keresztezhető rokon fajok hatalmas géntartalékokat jelentenek a nemesítők számára, és ennek jelentős többsége még kiaknázatlan.

2.2. Búza × árpa hibridek előállítása, búza/árpa addíciós vonalak és transzlokációk létrehozása

2.2.1. Búza × árpa hibridek előállítása

A búza és az árpa, két fontos termesztett gabonafélénk keresztezésével lehetővé válhatna az őszi árpa koraiságának, kedvező aminosav összetételének, a talaj magas sótartalmával szembeni toleranciájának, szárazságtűrésének, jó bokrosodási képességének beépítése a búzába. Ellenkező irányban, a búza szárerősségének, télállóságának átvitele az árpába még nagyobb kihívásnak tűnik. A két faj hibridizálására már a XX. század kezdetén is történtek kísérletek, azonban az első bizonyítottan sikeres keresztezésről csak 1973-ban számolt be Kruse dán kutató. Eredményes munkájának hatására több országban is kísérletek kezdődtek további új hibridek, majd utódok létrehozására. Viszonylag nagyobb gyakorisággal lehetett hibrideket létrehozni, ha anyai partnerként az árpát használták fel (Islam és Shepherd, 1990). Árpa × búza hibrideket hoztak létre számos kombinációban Islam és munkatársai (1975), Fedak (1977), Thomas és munkatársai (1977), Mujeeb-Kazi (1981), Clauss (1980), Shumny és munkatársai (1981), Wojciechowska (1985), Lángné Molnár és munkatársai (1985). Tizenhét árpafajta és tizenöt búzafajta keresztezése során a legmagasabb szemkötést a Chinese Spring búzafajta és a Betzes, illetve a Ketch árpafajták kombinálásával érték el. A szemkötést Islam és munkatársai (1975) 15,4%-nak találták, ezzel szemben Fedak (1980) 49%-os szemkötésről számolt be, bár az utóbbi szerzőnek csak a kapott szemek 2%-ából sikerült növényeket felnevelni. A hibrid növényeket minden esetben embriókultúra alkalmazásával nevelték fel, hiszen ebben a kombinációban az embriók endospermium hiányában a kalászban hagyva elpusztulnának (Islam és Shepherd, 1990). Különböző nemzetségek keresztezésekor célravezető az embriókultúra alkalmazása (Rédei, 1955; Heszky, 1972 a,b). Az árpa-búza hibridek teljes fokú hímszterilitást mutattak, de búzával való visszakeresztezéssel BC₁ majd BC₂ növényeket állítottak elő belőlük. Az első visszakeresztezéskor a szemkötés mértéke nagyon kismértékű (0,5 - 1,2 szem/kalász) volt (Islam és Shepherd, 1990). A BC₂ növényeken megfigyelt pistilloidia (a portokokból is a termőhöz hasonló képződmények keletkeznek) miatt az utódok a többszöri visszakeresztezés ellenére is sterilek maradtak, azaz ezen a vonalon nem lehetett fertilis addíciós vonalakat előállítani. A pistilloidia kiküszöbölésének érdekében megkezdtek a reciprok, búza × árpa hibridek létrehozását, amelyekben a búzát használták anyai partnerként, és az árpát beporzóként. Sokkal kevesebb kombinációban és sokkal kevesebb laboratóriumban sikerült

búza-árpa hibrideket létrehozni úgy, ha a búza volt az anyai partner (Islam és Shepherd, 1990; Fedak, 1980; Wojciechowska és Pudelska, 1993; Molnár-Láng és Sutka, 1994; Molnár-Láng és mtsai, 2000b; Jauhar, 1995; Taketa és mtsai, 1998). Islam és munkatársai (1978, 1981) azt tapasztalták, hogy ebben az irányban is a Chinese Spring búza és a Betzes árpa keresztezésekor kapták a legnagyobb szemkötést, ellenben ez mindössze 1,3% volt a reciprok kombinációban tapasztalt 15,4%-al szemben. Saját kísérleteinkben a Chinese Spring búza és a Betzes árpa keresztezésekor fitotronban, optimális feltételek mellett 3,3%-os szemkötést értünk el (Molnár-Láng és Sutka, 1994). A Martonvásári 50 árpafajta és a Chinese Spring tavaszi búza keresztezéséből, ha az árpát használtuk anyai partnerként több hibridnövényt állítottunk elő. Ezzel szemben a reciprok kombinációban, bár nagyon kismértékű szemkötést tapasztaltunk (0,18%), hibrid növényt felnevelni már nem tudtunk (Molnár-Láng és Sutka, 1994). Az első búza-árpa hibridek létrehozása után viszonylag rövid idő után beszámoltak az első búza/árpa (Chinese Spring tavaszi búza/Betzes tavaszi árpa) addíciós vonal előállításáról (Islam és mtsai, 1978, 1981). Ezt az addíciós sorozatot a megfelelő monoszóm vonalakkal keresztezve szubsztitúciókat hoztak létre az 1H és a 2H kromoszómák kivételével Islam és Shepherd (1992b, 1995) és Ya-Ping és munkatársai (2003).

Sorozatos próbálkozások ellenére is nehezen tudták bővíteni a keresztezésekbe sikeresen bevonható genotípusok körét, kevés agronómiailag is fontos genotípussal hoztak létre új hibrideket (Wojciechowska és Pudelska, 1993; Jauhar, 1995; Taketa és mtsai, 1998). A létrehozott új hibridek jelentős hányadán nem sikerült BC₁ szemeket előállítani, így az előállított új kombinációkból nem születtek fertilis utódok (Wojciechowska és Pudelska, 1993; Jauhar, 1995). A hibrid-előállítás hatékonyságát jelentősen növelték Koba és munkatársai (1991), akik a hibridek előállításához a búza × kukorica keresztezésekben már bevált 2,4 D kezelést alkalmazták. Több japán búzafajtát is bevontak a keresztezésekbe, amelyek közül a Norin 12, a Norin 61 és a Shinchunaga a Chinese Spring kínai búzafajtánál nagyobb szemkötést adtak a Betzes árpafajtával megporozva. A legnagyobb szemkötést (8,25%) a Norin 12 × Betzes kombinációban tapasztalták. Embriókultúra alkalmazásával az embriók többségéből tudtak növényt regenerálni (Koba és mtsai, 1991). A Shinchunaga búzafajta és a Nyugoruden árpafajta kombinációjából 5H és 6H árpa kromoszómákat tartalmazó addíciós vonalakat hoztak létre és előállítottak olyan transzlokációs vonalakat, amelyek a 42 búza kromoszóma mellett 5HS.5BL transzlokációs kromoszómapárt tartalmaztak (Koba és mtsai, 1997).

A Chinese Spring/Betzes addíciós sorozat előállítása óta mindössze a Shinchunaga búzafajta és a Nyugoruden árpafajta kombinációjából az 5H és 6H árpa kromoszómákat

tartalmazó addíciós vonalak létrehozásáról számoltak be, de nem állítottak elő gyakorlati szempontból jelentős európai búza- és árpafajtákkal új addíciós sorozatokat, amelyek az egyes agronómiai tulajdonságok tanulmányozására felhasználhatók lennének. Ezzel szemben búza/rozs addíciós vonalak számos fajtakombinációban a kísérletezők rendelkezésére állnak (Shepherd és Islam, 1988).

2.2.2. Más *Hordeum* fajokkal előállított hibridek

A termesztett hexaploid búza (*Triticum aestivum* L.) és a termesztett árpa (*Hordeum vulgare* L.) mellett más *Triticum* és *Hordeum* fajok közt is hoztak létre hibrideket, amelyek közül a legeredményesebbnek mondható a *Triticum turgidum* L. ssp. *durum* (Desf.) Husn. (szinonima: *T. durum*) és a *Hordeum chilense* Roem. et Schulz. keresztezéséből előállított hexaploid tritordeum (Martin és Sanchez-Monge Laguna, 1980, 1982). Korábban a *Hordeum chilense*-t a hexaploid *Triticum aestivum*-mal megporozva Martin és Chapman (1977) F₁ hibridet hoztak létre, amelynek kolchicin-kezelésével részlegesen fertilis amfidiploidot állítottak elő (Chapman és Miller, 1978). Az amfidiploidot búzával visszakeresztezve búza/*H. chilense* addíciós vonalakat hoztak létre Miller és munkatársai (1981). A *Hordeum chilense*-t a későbbiekben *Triticum durum*-mal megporozva hibridet, majd kolchicinnel kezelve 42 kromoszómaszámú fertilis amfidiploidokat állítottak elő (Martin és Sanchez-Monge Laguna, 1980, 1982). Miután az új amfidiploid az elsődleges tritikálénál kevesebb meiotikus kromoszóma-párosodási rendellenességet és fertilitási zavart mutatott, feltételezték, hogy az a tritikáléhoz hasonlóan új növényfajként a termesztésbe bevonható, és tritordeumnak nevezték el. A hexaploid tritordeum fehérjetartalmát 19 és 24% közt tapasztalták (Martin és Cubero, 1981), ezért a későbbiekben számos vizsgálatban részletesen tanulmányozták ennek az új fajnak a minőségi paramétereit.

A tritordeum részletes szántóföldi vizsgálata során, 6-7 évi öntermékenyítési ciklus után megállapították, hogy az új faj termése 20-40%-a a termesztett búzáénak, de fehérjetartalma a szárazanyag 17,6-25,2%-a is lehet (Cubero és mtsai, 1986). Egyéb minőségi paramétere (rost, lignin, cellulóz és hemicellulóz tartalma és aminosav összetétele) hasonlóak voltak a termesztett búzáéhoz. A citológiai vizsgálatok során kezdetben az új faj kromoszómaszámát és kromoszóma-párosodását vizsgálták Feulgen módszerrel, melynek során nagyfokú kromoszóma stabilitást állapítottak meg (Martin és Cubero, 1981). A későbbiek során C-sávozással (Fernandez és mtsai, 1985) és fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH), repetitív DNS szekvenciák segítségével tanulmányozták a *Hordeum*

chilense kromoszómákat (Cabrera és mtsai, 1995). Az *Aegilops squarrosa*-ból (szinonima *Ae. tauschii* Coss.) izolált pAs1 DNS klónnal végzett hibridizáció során a *H. chilense* kromoszómákon a búza D kromoszómáihoz hasonló hibridizációs mintázatot kaptak, a kromoszómák teloméráin erős hibridizációs jeleket tapasztaltak. Ezzel a próbával a *Hordeum vulgare* kromoszómák nem azonosíthatók, ez a próba az árpán szórt jelet ad (Schneider, 2001). A C-sávozás során kapott hibridizációs mintázat inkább a búza kromoszómáihoz hasonló, a *H. chilense* kromoszómákon erős telomérás sávok láthatók, ezzel szemben a *H. vulgare* kromoszómáin C-sávozáskor a centroméra közelében kapunk intersticiális sávokat (Cabrera és mtsai, 1995). A molekuláris citogenetikai vizsgálatok szerint a *H. chilense* genetikailag távol áll a termesztett árpától. A *Hordeum* fajok rendszerezéséről számos tanulmány jelent meg (Löve, 1982, 1984; Dewey, 1984; Szabó, 2004). Korábban a morfológiai megfigyelések alapján, majd az előállított interspecifikus hibridek kromoszóma-párosodási adatai szerint, később pedig a molekuláris genetikai vizsgálatokból levont következtetések alapján rendszerezték a *Hordeum* fajokat. Bothmer és munkatársai (1986, 1987) a kromoszóma-párosodási vizsgálatok alapján a *Hordeum* fajokat négy alapgenomba sorolják (I, Y, X és H). A későbbi molekuláris genetikai vizsgálatok alátámasztották ezt a rendszerezést (Svitashev és mtsai, 1994), miszerint I genommal rendelkezik a *H. vulgare* és a *H. bulbosum* L., Y genommal a *H. murinum* L., a H genommal rendelkező fajok közé tartozik többek közt a *H. chilense* és X genomja van a *H. marinum* Huds.-nak. A rendszerezés alapján is egymástól viszonylag távol áll a *H. vulgare* és a *H. chilense*.

A tritordeum agronómiai tulajdonságainak javítása érdekében további keresztezéseket végeztek elsősorban tritikáléval, majd az utódokat különböző citogenetikai módszerekkel elemezték (Fernandez-Escobar és Martin, 1985; Lima-Brito és mtsai, 1996). FISH-sel az utódokban a *H. chilense* és a rozs kromoszómákat is azonosítani tudták (Lima-Brito és mtsai, 1996). A hexaploid tritordeumot keresztezték *H. vulgare*-val is, az F₁ hibrid kolchicin kezelésével előállított amfidiploid azonban sterilnek bizonyult (Martin és mtsai, 1995). A tritordeum transzformációjával transzgénikus vonalakat hoztak létre (Barcelo és mtsai, 1994), amelyeket később tenyészkerti kísérletekben is tanulmányoztak (Hernandez és mtsai, 2001).

A *Hordeum chilense*-n kívül a következő *Hordeum* fajokat hibridizálták a búzával:

- *H. spontaneum* [szinonima: *H. vulgare* ssp. *spontaneum* (C. Koch) Thell] (Islam és Shepherd, 1990; Taketa és mtsai, 1995),
- *H. bulbosum* L. (Barclay, 1975; Blanco és mtsai, 1986),
- *H. bogdanii* Wil. (Kimber és Sallee, 1976),
- *H. pussillum* Nutt (Finch és Bennett, 1980),

- *H. geniculatum* All. (Clauss, 1983),
- *H. pubiflorum* Hook.f. (Fedak, 1983),
- *H. californicum* Covas & Stebbins [szinonima: *Hordeum brachyantherum* Nevski ssp. *californicum* (Covas & Stebbins)] (Gupta és Fedak, 1985),
- *H. marinum* Huds. (Jiang és Dajun, 1987)
- *H. depressum* (Scribn. & Smith) Rydb. (Jiang és Dajun, 1987).

2.2.3. A búza × árpa hibridek *in vitro* szaporítása

A steril faj- és nemzetséghibridek fenntartásának és elszaporításának egyik módja a hibridek vegetatív úton, szövettanyészetben - *in vitro* - történő elkalluszosítása. A távoli keresztezésekben létrehozott faj- és nemzetséghibridek sokszor nemcsak hímsterilek, de nőfertilitásuk is olyan kismértékű, hogy az egyik szülővel megporozva is csak rendkívül kismértékben kötnek szemet. A szövettanyészet lehetőséget nyújt a kis gyakorisággal előállítható hibridek elszaporítására, így a további visszakeresztezésekhez megfelelő számú utód előállítására. A gabonafélék körében előállított faj- és nemzetséghibridek *in vitro* szaporításáról több hibridkombinációban is beszámoltak: árpa × rozs - Shumny és Pershina 1979; *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. × *P. purpureum* Schumach - Vasil és Vasil, 1981; búza × rozs hibridek - Armstrong és mtsai, 1983, Doré és mtsai, 1988; búza-*Agropyron* hibridek – Sharma és mtsai, 1984; Bai és Knott, 1993; *Elymus canadensis* L. × *Psathyrostachys juncea* (Fisch.) Nevski - Park és mtsai, 1990. Az utódok citológiai vizsgálata során minden esetben eltéréseket figyeltek meg a kiindulási hibridekhez képest. Megállapították, hogy a növények *in vitro* szaporítása folyamán megfigyelt szomaklonális variabilitás (Larkin és Scowcroft, 1981) a faj- és nemzetséghibridek szövettanyészetben való fenntartása során hasznos átrendeződéseket eredményezhet. Sikeresen állítottak elő F₁ hibridekből megduplázódott kromoszómaszámú amfidiploidokat (Doré és mtsai, 1988, Ter Kuile és mtsai, 1988), figyeltek meg transzlokációkat (Sharma és mtsai, 1984), illetve esetenként a fertilitás megnövekedését tapasztalták a regeneránsokon (Sharma és mtsai, 1984; Fedak és Grainger, 1986; Molnár-Láng és mtsai, 1991).

Búza-árpa hibrideket szövettanyészetben szaporítottak el Pershina és Shumny (1981), Chu és munkatársai (1984), Junming és munkatársai (1985), Galiba és munkatársai (1986), Surikov és Kissel (1988), Koba és munkatársai (1988). A regeneránsok részletes citológiai analíziséről Junming és munkatársai (1985), Shimada és munkatársai (1987) és Molnár-Láng

és munkatársai (1991) számolnak be. Junming és munkatársai (1985) és Koba és munkatársai (1988) is a kiindulási hibridtől (28) eltérő kromoszómaszámot figyeltek meg egyes regeneránsokban (21-27) és mindnyájan beszámoltak amfidiploid sejtek előfordulásáról is. A telocentrikus kromoszómák megjelenése a regeneránsokban több kísérletben is megfigyelhető volt (Junming és mtsai, 1985; Koba és mtsai, 1988; Molnár-Láng és mtsai, 1991). A regeneráns hibridek meiózisének részletes elemzését végezték el Molnár-Láng és munkatársai (1991), akik megállapították, hogy nőtt a homeológ kromoszóma-párosodások száma. Hasonló következtetésre jutott Dahleen (1999) is árpa × vadrozs hibridek szövettényészetben regenerált utódain is.

2.2.4. A kromoszómák párosodása a búza × árpa hibridekben

A hibridek kromoszómaszámát általában mitózisban, a hibridek osztódó gyökércsúcsaiból készült preparátumokon állapítják meg. A kromoszómaszám ellenőrizhető még a felnevelt hibridek fejlődő kalászaiból kiemelt portokokból készült preparátumokon, a pollenanyasejtek meiózisének I. metafáziséban is. A meiózis elemzése során ráadásul nemcsak a kromoszómaszám határozható meg, hanem vizsgálhatjuk a hibridekben az idegen kromoszómák közt esetlegesen előforduló párosodást is, amelyből a szülőpartnerek közt fennálló rokonsági viszonyokra is következtethetünk. A homológ genomok kromoszómái egymással párosodnak, míg a távoli rokonsági kapcsolatban álló homeológ genomok kromoszómái egymással általában nem párosodnak.

Búza × árpa hibridek meióziséban zömében 28 univalens kromoszómát figyelt meg Islam és Shepherd (1980), bár néhány sejtben a kromoszómák párosodása is megfigyelhető volt, átlagosan 0,7 bivalens fordult elő egy pollenanyasejtben. Ennél nagyobb mértékű kromoszóma-párosodást tapasztalt Fedak (1977) árpa × búza hibridek meióziséban, amelynek következményeként a hibridekben a pollenanyasejtenkénti kiazmak száma 1,82 volt. Ez mindenképpen magasabb, mint amennyit a búza haploidokban korábban tapasztaltak (Riley és Law, 1965), így feltehető, hogy az árpa és a búza kromoszómák is párosodnak. A két távoli nemzetség kromoszómái közt megfigyelhető homeológ párosodásra Fedak 1977-ben a Nature-ben hívta fel a figyelmet, és az akkori módszerek ismeretében javasolta ennek ellenőrzését Giemsa technikával. Későbbiekben Jauhar (1995) a Luther árpafajtaival létrehozott búza × árpa hibridekben a kiazmak számát 2,16-6,72 között állapította meg. Adataiból feltehető volt a búza és az árpa kromoszómák közti párosodás, de miután Feulgen módszerrel elemezte a meiózisban a kromoszómákat, így az egyes kromoszómákat nem tudta

azonosítani. Sajnos a hibridekből előállított két BC₁ növény kiültetés után elpusztult. A Chinese Spring *ph* mutánssal előállított búza × árpa hibridekben pollenanyasejtenként átlagosan 5,03-6,63 bivalens volt megfigyelhető, ezenkívül kismértékben trivalenseket és quadrivalenseket is megfigyeltek (Sethi és mtsai, 1986), azonban ebben az esetben sem lehetett egyértelműen bizonyítani a búza és az árpa kromoszómák párosodását. Több árpa × búza hibridkombinációban részletes meiózis elemzést végzett Wojciechowska (1985), aki a kiazmák számát a 28 kromoszómaszámú hibridsejtekben 1,17-1,98-nak találta.

A búza és az árpa kromoszómák párosodásának kimutatására Islam és Shepherd (1988) dolgozott ki először megfelelő módszert. Diteloszómás búza/árpa addíciós vonalakat kereszteztek *Ph* szupresszor gént hordozó *Ae. speltooides*-sel. Búza monoszómás háttérben háromszoros monoszómás addíciós vonalakat hoztak létre, amelyek közül az egyik a 19 bivalens búza kromoszóma mellett tartalmazott 1 db 5B *ph* mutáns kromoszómát, egy 3HL árpa kromoszómakart és egy 3A búzakromoszómát. Egy másik vonalban az 5B *ph* mutáns mellett egy 6HS és egy 6B kromoszóma volt jelen. Vizsgálták a morfológiailag jól megkülönböztethető telocentrikus árpa kromoszómák párosodását a búza kromoszómákkal. Hat különböző árpa telocentrikus kromoszóma párosodását vizsgálták (2HS, 4HS, 4HL, 5HL, 6HS, 7HL) az *Ae. speltooides*sel végzett keresztezésekben. A telocentrikus és nem telocentrikus kromoszómák közt a párosodás a pollenanyasejtek 1,2-4,5%-ában fordult elő. A háromszoros monoszómás addíciós vonalakban, a 3HS és a 6HS árpa kromoszómakart tartalmazó növényekben a párosodás csak a sejtek 0,3-0,7%-ában fordult elő. Kísérletükkel bizonyították, hogy az egymással genetikailag távoli rokonsági kapcsolatban álló búza és árpa kromoszómák egymással párosodhatnak, azaz rekombinációk jöhetnek létre.

Búza × árpa hibridek meiotikus instabilitására számos kutató felhívta a figyelmet, azaz a meiózisban zömében tapasztalható 28 kromoszóma mellett hypo- és hyperploid kromoszómaszámú sejtek is előfordulnak (Fedak, 1980; Mujeeb-Kazi és Rodriguez, 1983; Islam és Shepherd, 1980; Wojciechowska, 1985). A meiózis során Islam és Shepherd (1980) megfigyelték, hogy egyes sejtekben a kromoszómaszám megduplázódása tapasztalható (restitution nuclei). A hibridek meiózisának I. metafázisában az univalens kromoszómák az equatoriális síkban gyűlnek össze és sok sejtben ahelyett, hogy az anafázis I-ben a kromoszómák a két pólus felé vándorolnának, a kromoszómák egy kromatintömeget képeznek, együtt maradnak, azaz megduplázódott kromoszómaszámú sejtek jönnek létre. Azonban ezekben a sejtekben sokszor nem megy végbe a meiózis második szakasza, így mégsem alakulnak ki teljes kromoszómaszámú mikrospórák, amelyek helyreállíthatnák a hibridek fertilitását (Islam és Shepherd, 1980). Feltehető, hogy azok a petesejtek, amelyek

megtermékenyülése révén a hibridek visszakeresztezésekor mégis kapunk szemet, a megduplázódott kromoszómaszámú megaspórákból jöttek létre. Búza × árpa hibridek meiózisát genomikus *in situ* hibridizációval (GISH) vizsgálva Molnár-Láng és munkatársai (2000b) a kiazmák számát Mv9 kr1 × Igri és Asakaze komugi × Manasz kombinációkban 1,59-nek tapasztalták. Ugyanezen hibridek szövettényészetben elszaporított utódaiban a kiazmák száma 4,72-re és 2,67-re nőtt az egyes kombinációkban. GISH-sel egyértelműen bizonyították a búza és az árpa kromoszómák párosodását, melynek következtében az utódokban rekombinációk várhatók a két genom közt.

2.2.5. Búza/árpa rekombinációk, transzlokációk előállítása

A búza és az árpa keresztezéséből elsőként Islam és Shepherd (1992a) hoztak létre rekombinációkat. Háromszoros monoszómás addíciókat állítottak elő búza/árpa diteloszómás szubsztitúciós vonalak Chinese Spring ph mutánsal végzett keresztezéséből. A háromszoros monoszómás addíciók a 19 búza kromoszómapár mellett tartalmaztak egy árpa telocentrikus kromoszómát, egy azzal homeológ búza kromoszómát és egy 5B ph mutáns kromoszómát. Ezzel a módszerrel a háromszoros monoszómás addíciók utódai közül 6 darab 6HL és 6 darab 3HL kromoszóma-szegmentumot hordozó búza/árpa rekombinációt állítottak elő. A rekombinációk meglétét izoenzim vizsgálatokkal bizonyították, az utódok hordoztak a 6A és a 6H, illetve a 3A és a 3H kromoszómán lokalizált izoenzimeket is. Szintén a ph mutáns gén hatását felhasználva hoztak létre rekombinációkat Sherman és munkatársai (2001) az Islam és munkatársai (1981) által előállított 4H és 5H búza/árpa addíciós vonalakból. A rekombinációk létrejöttét PCR alapú molekuláris markerekkel igazolták.

Búza-árpa transzlokációk előfordulását GISH-sel először Schwarzacher és munkatársai mutatták ki 1992-ben. A transzlokációs vonalat Islam és Shepherd állították elő (nem publikált adat) és izoenzim vizsgálatokkal bizonyították, hogy ebben a vonalban a 4HL árpa kromoszómakarnak legalább az árpa β -amiláz izoenzimet kódoló gént hordozó szakasza beépült. A GISH vizsgálat kimutatta, hogy a transzlokációs vonalban a teljes 4HL kromoszómakar jelen van, azaz centrikus fúzió jött létre a búza és az árpa közt. Spontán transzlokációk létrejöttét figyelték meg a Shinchunaga búza és a Nyugoruden árpa keresztezéséből származó utódokban Koba és munkatársai (1997). A transzlokációs kromoszómát C-sávzással azonosították, és a korábbi elnevezés szerint megállapították, hogy az az árpa 7-es kromoszómájának rövid karja és a búza 5B kromoszóma hosszú karja közt jött létre. Az árpa kromoszómák későbbi átnevezése során, a búzával való homeológia

alapján a régi 7-es kromoszóma az 5H nevet kapta (Linde-Laursen és mtsai, 1997), így valójában homeológ transzlokáció jött létre.

Schubert és munkatársai (1998) az *Aegilops cylindrica* 2C kromoszómájának gametocid hatását kihasználva állítottak elő búza-árpa transzlokációkat búza/árpa diszómás addíciós vonalakból. A 7H búza/árpa addíciós vonalat a 2C búza/*Ae. cylindrica* addíciós vonallal keresztezték, majd a kétféle idegen fajú kromoszómát tartalmazó vonalat öntermékenyítették. Az utódok közül árpa deléciókat és búza-árpa transzlokációkat tartalmazó vonalakat válogattak ki. Több mint tíz 7H árpa kromoszóma-szegmentumot hordozó transzlokációs vonalat állítottak elő. Az árpa kromoszóma-szegmentumok beépülését GISH-sel és repetitív próba segítségével (HvT01) végzett FISH-sel mutatták ki. Az előállított 7H deléciós és transzlokációs vonalakat felhasználták a 7H árpa kromoszóma fizikai térképezésére (Serizawa és mtsai, 2001). Molnár-Láng és munkatársai (2000a) szövettényészetben regenerált búza-árpa hibridekből állítottak elő transzlokációkat, amelyet GISH-sel mutattak ki. A kiválogatott homozigóta transzlokációs vonalakban az árpa kromoszóma-szegmentumok eredetét molekuláris markerekkel határozták meg (D. Nagy és mtsai, 2002). A transzlokációs vonalakba az 1H, a 3H, a 4H és az 5H kromoszómák különböző méretű szegmentumai épültek be. A transzlokációs vonalakat felhasználták az árpa kromoszómákon korábban lokalizált mikroszatellit markerek fizikai térképezésére is.

2.3. Idegen fajú génátvitel a rozsból a búzába

2.3.1. Búza × rozs hibridek, tritikálé előállítása

A rozs a termesztett gabonafélék közül, a búzával legszorosabb rokonsági kapcsolatban álló faj, ezért már régóta törekednek a kutatók a búza és a rozs keresztezéséből kedvező tulajdonságokkal rendelkező utódok előállítására. A rozs a talajjal szemben igénytelen, jó szárazságtűrő és a betegségekkel szemben általában ellenálló faj. Az első keresztezések célja volt a búza és a rozs előnyös tulajdonságainak ötvözése egy új fajban.

Az 1876-ban bemutatott első steril búza × rozs hibridek (Wilson, 1876) megszületése után tizenöt évvel Rimpau (1891) már termékeny hibridek létrehozásáról számolt be. Csak jóval később, az 1930-as években fedezték fel sikerének titkát, hogy a fertilis hibridben végbement a kromoszómák számának spontán megkettőződése, azaz véletlenül oktoploid amfidiploidot állított elő (lásd Kiss, 1968). A kolchicin poliploidizáló hatásának felfedezésével intenzív oktoploid tritikálé nemesítés kezdődött az 1930-as években

(Müntzing, 1939). Miután az oktoploid tritikálék nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket, az 1960-as években a kutatók a hexaploid tritikálék előállítására koncentráltak (lásd, Sutka, 2004; Kiss, 1968). Hazánkban Kiss és Rédei (1952) munkájának eredményeként született meg az első termékeny oktoploid és hexaploid tritikálé. A létrehozott kombinációkból állították elő az első hexaploid tritikálé fajtákat (Kiss, 1968), amelyek nagy nemzetközi elismerést váltottak ki, és számos külföldi tritikálé nemesítési programban felhasználták. A tritikálé nemesítés eredményeként ma már hazánkban is kb. 150 ezer hektáron termesztnek tritikálé fajtákat.

2.3.2. Búza/rozs addíciós vonalak

Búza/rozs addíciós vonalakat elsőként O'Mara (1940) állított elő. Módszerének lényege, hogy az F_1 hibridből kolchicin kezeléssel amfidiploidot állít elő, amelyet visszakeresztez búzával. Az amfidiploidok búzával való visszakeresztezése után első lépésben 49 kromoszómaszámú BC_1 növények várhatók, amelyek a 42 búza kromoszóma mellett a rozs teljes haploid kromoszómakészletét tartalmazzák. További visszakeresztezések során a rozs kromoszómák száma redukálódik, és már a második visszakeresztezés után is kiválogathatók monoszómás addíciós vonalak, amelyek a búza genom mellett már csak egy rozs kromoszómát tartalmaznak. A monoszómás addíciók öntermékenyítése után diszómás addíciók keletkezhetnek, amennyiben az idegen (rozs) kromoszóma a petesejten és a hímivarsejten keresztül is átadódik. A diszómás addíciós vonalak létrejöttének az aránya a monoszómás addíciós vonalakkal sokkal kisebb, mint arra a mendeli törvények alapján számítani lehetne, miután az idegen kromoszómát hordozó hímivarsejtek kevésbé kompetitívek, mint a normál kromoszómaszámú gaméták. Általában a diszómás addíciós vonalak előfordulása a monoszómás addíciós vonalak utódai közt 3-4%, de ez fajtánként és kromoszómánként is változik. A búza-idegen fajú addíciós vonalak kiváló kiindulási anyagai a további génátviteli munkáknak, ezekből a vonalakkal idegen fajú szubsztitúciók, majd transzlokációk állíthatók elő (Gale és Miller, 1987). A módszer kidolgozása után számos fajtakombinációban állítottak elő búza-rozs diszómás addíciós vonalakat:

Chinese Spring- Imperial (Driscoll és Sears, 1971)

Holdfast- King II, (Riley és Chapman, 1958)

Chinese Spring-King II (Miller nem publikált adat, lásd Shepherd és Islam 1988)

Kharkov-Dakold (Evans és Jenkins, 1960)

A teljes sorozatok mellett különböző rozsfajták egyes kromoszómaikat is addicionálták egy-egy búza genotípushoz:

Chinese Spring - Rosen (2RL) (Driscoll és Jensen, 1963)

Chinese Spring - Petkus (1R) (Lelley nem publikált adat, lásd Shepherd és Islam 1988)

Chinese Spring - Emery (5R) (Chang és mtsai, 1973)

Chinese Spring - Florida Black (5R) (Chang és mtsai, 1973)

Chinese Spring - Gator (5R) (Chang és mtsai, 1973)

Chinese Spring - Prolific (5R) (Chang és mtsai, 1973)

Chinese Spring - Merced (5R) (Chang és mtsai, 1973)

Chinese Spring - Weedy (5R) (Chang és mtsai, 1973)

Chinese Spring - Weser (5R) (Chang és mtsai, 1973)

Chinese Spring - White (5R) (Chang és mtsai, 1973)

Chinese Spring - Wrens (5R) (Chang és mtsai, 1973)

Chinese Spring - South Australian rye (1R) (Hossain és Driscoll, 1983)

Chinese Spring- *Secale montanum* Guss. (1R, 2R, 4R, 5R, 6R) (Miller nem publikált adat, lásd Shepherd és Islam, 1988)

2.3.3. Búza/rozs szubsztitúciós vonalak

1971-ben Zeller és Fischbeck megállapították, hogy a Zorba búzafajtában az 1B kromoszóma helyett egy pár 1R kromoszóma van jelen. Kiderült, hogy ez a fajta egy búza-rozs keresztezésre vezethető vissza, amelyről Katterman számolt be 1937-ben. A búza-rozs keresztezéseket Katterman Weihestephanban (München mellett) végezte, és a hibridek búzával visszakeresztett utódaiban spontán szubsztitúció jött létre. Érdekes módon ezzel párhuzamosan Riebesel Salzmünde-ben (Halle mellett) búza-rozs hibridekből létrehozta a "Salzmunder Bartweizen" fajtát, amely szintén egy 1R(1B) szubsztitúciót hordozott (Zeller és Hsam, 1983). A későbbi molekuláris genetikai vizsgálatok kiderítették, hogy mindkét szubsztitúció egymással azonos és a Petkus rozsfajtából ered (Schlegel és Korzun, 1997). A spontán szubsztitúciók kimutatása mellett megkezdtek az egyes rozs kromoszómák behelyettesítését is egyes búza kromoszómák helyére. A szubsztitúciók előállítása azonban az addíciós vonalakénál is nehezebb és hosszabb időt vesz igénybe. Előállításuk bevált módszere az idegen fajú diszómás addíciós vonalak keresztezése a monoszómás vonalakkal (Gale és Miller, 1987). A keresztezés után kiválogatják a 42 kromoszómaszámú vonalakat, amelyek genomkonstitúciója várhatóan 20^{II} búza + 1^I búza + 1^I idegen fajú kromoszóma. Ezeknek a

növényeknek öntermékenyített utódai közül kiválogathatók a 20 pár búza kromoszóma mellett egy pár idegen fajú kromoszómát hordozó egyedek. Búza-rozs szubsztitúciókat többnyire az előzőleg felsorolt búza-rozs addíciós vonalakból állítottak elő, így behelyettesítették az Imperial, a King II, a Dakold, a Petkus, a *Secale montanum* kromoszómáit egy-egy búza kromoszóma helyére (lásd Shepherd és Islam, 1988).

A szubsztitúciók az addíciós vonalaknál is jobban használhatók az idegen fajú kromoszómákon lokalizált gének térképezéséhez és a génátviteli munkákban is, hiszen a vonalak euploid kromoszómaszámúak, így citológiaiilag stabilak és a növények fertilitása nem vagy csak alig marad el a normál búzáétól.

2.3.4. Búza/rozs transzlokációk előállítása, az 1BL.1RS transzlokáció elterjedése a termesztett búzafajtákban

A Weihe-Stephanban nemesített Zorba és a Salzmünde-ben előállított Salzmünder Bartweizen búzafajtákban kimutatott 1B(1R) spontán szubsztitúciókból egymással párhuzamosan Mettin és munkatársai (1973) Gaterslebenből, illetve Zeller és Fischbek (1971) Weihe-Stephanból spontán 1BL.1RS transzlokációk létrejöttéről számoltak be. Megállapították, hogy ez a transzlokáció az 1RS kromoszóma rövid karján több hasznos rezisztenciagént hordoz a következő kórokozókkal szemben: levélrozsda (*Lr26*), szárhozsda (*Sr31*), sárgarozsda (*Yr9*), és liszttharmat (*Pm8*) (Bartos és Bares, 1971; Bartos és mtsai 1973). Megfigyelték a későbbiekben, hogy a kedvező rezisztenciagének jelenlétén túl ez a transzlokáció a produktivitásra is kedvező hatással van (Lukjanyenko, 1966; Rajaram és mtsai, 1983; Bedő és mtsai, 1993; Villareal és mtsai, 1991, 1998; Lelley és mtsai, 1999). Jelenleg a világon több mint háromszáz köztermesztésben lévő búzafajtában mutatható ki az 1BL.1RS transzlokáció és ezzel a legelterjedtebb idegen fajú transzlokáció a búzában (Rabinovich, 1998). Magyarországon a regisztrált búzafajták 53%-a (Kőszegi és mtsai, 2000; Kertész és mtsai, 1997), a korábbi Csehszlovákiában a minősített búzafajták egyharmada hordozta ezt a transzlokációt (Bartos és Stuchlikova, 1987). 1988-ban a CIMMYT program fejlett törzseinek mintegy 50%-ában (Villareal és mtsai, 1991), az Egyesült Államok búzafajtáinak 7 százalékában az 1RS.1BL transzlokáció kimutatható volt (Lukaszewski, 1990).

A transzlokáció széleskörű elterjedésének magyarázata elsősorban az, hogy az elveszett 1BS kromoszómák hiányát a nagyfokú homeológia miatt az 1RS kromoszómák jól kompenzálják, szemben sok más transzlokációval, ahol a hozzáadott gének nem képesek

helyettesíteni a kieső kromoszómaszakaszon lokalizált géneket (Friebe és mtsai, 1996a). Az 1BL.1RS transzlokáció hátrányos tulajdonsága azonban, hogy a búza sütőipari minőségét bizonyos genetikai környezetben hátrányosan befolyásolhatja. Ez köszönhető részben az 1BS karon elhelyezkedő LMW (kis molekula súlyú) glutenin tartalékfehérje gén elvesztésének, másrészt a vízoldható, monomer szekalin rozs tartalékfehérje megjelenésének (Graybosch, 2001). Az 1RS kromoszóma karon lokalizált rezisztencia gének többsége mára már elvesztette hatékonyságát az időközben kialakult újabb kórokozó rasszok miatt, így további fennmaradása az új fajtákban elsősorban termésmnövelő hatásával magyarázható. Schlegel és Korzun (1997) termésmnövelő QTL-t tudtak azonosítani az 1RS kromoszómakaron. Az összes termesztett búzafajtában fellelhető 1BL.1RS transzlokáció ugyanarra a Petkus rozs fajtára vezethető vissza, amely ebben a kromoszómakarban nagyfokú uniformitásra utal (Schlegel és Korzun, 1997). A genetikai variabilitás növelésére Martonvásáron a Molekuláris Citogenetika Csoport munkatársai (D. Nagy és mtsai, 1998) új oktoploid tritikálékat állítottak elő, amelyeket 1B.1RS transzlokációkat hordozó búzafajtákkal visszakeresztezve új rekombinánsokat hoztak létre az 1RS karban (D. Nagy és mtsai, 2003). A rekombinánsokat később felhasználták az 1RS karon elhelyezkedő molekuláris markerek térképezésére (D. Nagy és Lelley, 2003).

Az 1BL.1RS transzlokációból további rekombinációkat állítottak elő Ausztráliában (Koebner és Shepherd, 1986; Koebner és mtsai, 1986). Sikerült csökkenteni az 1RS kar méretét, amelynek következtében javult a vonalak tartalékfehérje összetétele. További rekombinációkat állított elő Lukaszewski (2000, 2001), akinek sikerült elválasztani a szekalin gént a rezisztencia génektől. Az új rekombinációkat *ph1* mutáns vonalak felhasználásával állította elő. Több mint 20 ezer utód C-sávozással végzett elemzése után 139 rekombináns növényt talált, amelyek közül 30 utódban sikerült a szekalin lókuszt helyére az 1BS kromoszóma különböző méretű szegmentumait beépíteni. A rekombinánsok közül kettőben az integrálódott kromoszóma szakasz mindössze 1,4 illetve 3,2 cM hosszúságú volt és hordozták a *Gli-1/ Glu-3* lókuszt. A rekombinánsokban két helyre épült be interkaláris 1BS kromoszóma szakasz: az első hordozta a *Gli-1/ Glu-3* lókuszt, a második behelyettesítette a szekalin lókuszt helyét. Az 1BL.1RS transzlokációt a tetraploid búzába is beépítették és így felhasználható a durum fajták rezisztenciájának, termőképességének javítására is (Friebe és mtsai 1987, 1989)

Sebesta és munkatársai (Wood és mtsai, 1974; Sebesta és Wood, 1978) a Gauchó oktoploid tritikálé röntgenbesugárzásával 1AL.1RS transzlokációt állítottak elő, amelyben az Insave rozsfajta 1RS kromoszómakarja fuzionált a búza 1A kromoszóma hosszú karjával. Az

Insave rozs 1RS kromoszómakarja levéltetűvel szembeni *Gb2* rezisztenciagént és lisztharmattal szembeni *Pm17* rezisztenciagént hordoz (Lowry és mtsai, 1984; Heun és mtsai, 1990). Az 1AL.1RS transzlokációt hordozó búzafajtát Amigo néven jelentették be. Kiderült, hogy az Amigo fajta az 1RS rozs kromoszómakaron kívül *Agropyron* kromoszóma-szegmentumot is tartalmaz, amelynek köszönhető ebben a genotípusban az *Lr24* és az *Sr24* levél és szárrozsa rezisztencia gének jelenléte (The és mtsai, 1992; Jiang és mtsai, 1994). Az 1AL.1RS transzlokáció több martonvásári búzafajtában is fellelhető (Szakács és mtsai, 2004). Marais és munkatársai (1994) a Turkey 77 rozsfajtából származó 1RS kromoszómakart építették be a búzába. Ezen a kromoszómakaron orosz levéltetű (*Diuraphis noxia* Mordvilko) elleni rezisztenciagén található. A transzlokációt homológ rekombináció révén hozták létre, a Veery búzafajtában a Turkey rozsfajta kromoszómakarjával cserélték ki a Petkus rozs kromoszómakart.

További transzlokációkban a rozs 2R, 3R, 4R, 5R, 6R, 7R kromoszómaínak egy-egy szakaszát építették be a búzába (Driscoll és Jensen, 1963; Mukade és mtsai, 1970; Acosta, 1962; Zeller és Koller, 1981; Friebe és Larter, 1988; Schlegel és mtsai, 1991; Sears és mtsai, 1992; Mukai és mtsai, 1991b; 1993a), ezek azonban nem terjedtek el a gyakorlatban. Feltehetően a rozs genomban a búzához képest végbement számos átrendeződés miatt ezek a kromoszómakarok nem képesek kompenzálni a kieső szakaszokat (Devos és mtsai, 1993).

2.4. Génátvitel *Aegilops* fajokból a búzába

2.4.1. Búza × *Aegilops* hibridek előállítása

A termesztett búzával legszorosabb rokonsági kapcsolatban álló vad fajok a kecskebúza, azaz az *Aegilops* fajok. A nagyfokú genetikai hasonlóság miatt több kutató (Bowden, 1959; Morris és Sears, 1967) javasolta az *Aegilops* fajok *Triticum* nemzetségbe való rendszertani besorolását, azonban az utóbbi időben mégis két külön nemzetséggént való rendszerezésük (MacKey 1966; van Slageren, 1994) az elfogadott. Nemcsak tudományos szempontok támasztják alá a továbbiakban is a *Triticum* és az *Aegilops* fajok külön nemzetségbe való besorolását, hanem gyakorlati okok is, így ezek a fajok a különböző génbankokban jobban elkülöníthetők, a megfigyelések a korábbi eredményekkel könnyebben összevethetők.

Az *Aegilops* nemzetségbe 11 diploid, 10 tetraploid és 2 hexaploid faj tartozik (van Slageren, 1994). Rendkívül nagy változatossággal rendelkeznek számos tulajdonság

tekintetében, megtalálhatók köztük különböző biotikus és abiotikus stresszekkel szemben ellenálló vonalak (Gill és mtsai, 1983, 1985, 1986; Raupp és mtsai, 1988, 1993, 1995, 1997). A nagyfokú genetikai diverzitás részben széleskörű elterjedésüknek köszönhető, másrészt természetes változékonyságuk fennmaradt, így máig folyik a különböző vonalak begyűjtése természetes élőhelyeikről a világ jelentős génbankjaiba. Az *Aegilops* fajok általában a mediterrán klímájú területeken fordulnak elő, nyugaton a Kanári szigetekig, majd a Földközi tenger körül, a Közel-Keleten, a Balkánon, a Transzkaukázusi területeken, Afganisztánban és keleten Nyugat-Kínáig megtalálhatók. Magyarországon az *Aegilops cylindrica* fordul elő a természetben (Lelley és Rajháthy, 1955; Dégen, 1917).

Korábban már Percival (1921) is feltételezte, hogy az *Aegilops* fajok fontos szerepet játszottak a termesztett búza kialakulásában. A *Triticum aestivum* genomformulája $2n = 6 \times = 42$, AABBDD, amely ebben a fajban három különböző eredetű genom meglétére utal. Az A genom donorja a *Triticum urartu* vad diploid faj (Feldman, 2001). A B genom pontos őseit máig nem sikerült megtalálni, ezért a B genom evolúciójáról több feltételezést is kidolgoztak. Az eddigi eredmények alapján abban megegyeznek a kutatók, hogy a B genomhoz legközelebb álló fellelhető vad faj az *Aegilops speltoides*, miután ennek S genomja hasonlít leginkább a termesztett búza B genomjára. Az utóbbi időben végzett molekuláris genetikai vizsgálatok megállapították, hogy az *Ae. speltoides* S genomja a tetraploid *Triticum timopheevii* G genomjával szinte azonos (Dvorak, 1998). A B genommal teljesen megegyező genomot tartalmazó diploid vad faj az évezredek során vagy eltűnt, vagy az evolúció során az *Ae. speltoides* S genomja olyan változásokon ment át, amely miatt már jelentős különbségek mutathatók ki a termesztett búza B genomja és az *Ae. speltoides* S genomja közt (Belea és mtsai, 1991; Bálint és mtsai, 2000; Feldman, 2001). Először egy tetraploid AABB genommal rendelkező faj, a *Triticum turgidum* L. ssp. *diccoccoides* (Körn. ex Asch. & Graebn.) Thell. jött létre, amely később kereszteződött a D genom őseivel, az *Aegilops tauschii*-val (McFadden és Sears, 1946), és így keletkezett a ma termesztett hexaploid búza. A búza származására kidolgozott elképzeléseket ma már több módon is megerősítették, ennek egyik bizonyítéka a szintetikus hexaploid búza előállítása, amely teljes hasonlóságot mutat a termesztett búzával. A legújabb molekuláris vizsgálatok a hexaploid búzában a diploid fajokhoz képest számos átrendeződést (deléciókat, transzlokációkat, duplikációkat) is kimutattak (Feldman és Levy, 2003), amelyek az evolúció során a poliploid fajokban fellépnek.

Búza \times *Aegilops* spontán hibridek előfordulását Franciaországban, Montpellier mellett Fabre és munkatársai már 1850-ben megfigyelték (lásd Lelley és Rajháthy, 1955).

Magyarországon Dégen (1917) számolt be spontán *Aegilops cylindrica* × *Triticum aestivum* hibridek létrejöttéről, amelyeken összesen hat szemet talált, közülük kettő csírázóképesnek bizonyult.

Mesterséges keresztezésekkel számos kutató állított elő búza × *Aegilops* hibrideket, majd később amfidiploidokat (Kihara, 1924; Tschermak és Bleier, 1926; Lelley és Rajháthy, 1955; Belea, 1986).

2.4.2. Búza/*Aegilops* addíciós, szubsztitúciós vonalak

A *Triticum aestivum* × *Aegilops* keresztezésekből számos komplett addíciós sorozatot sikerült előállítani, annak ellenére, hogy ez bizonyos fajoknál nehézségekbe ütközik. Egyes *Aegilops* fajok kromoszómáin gametocid gén található, amelynek következtében az utódokban kromoszómatörések, deléciók figyelhetők meg, amelyek sok esetben sterilitást okoznak (Endo és Gill, 1996). Az *Aegilops cylindrica* 2C kromoszómáján írtak le egy gametocid gént, amely bár gátolja a teljes addíciós sorozat létrehozását, mégis rendkívül hasznosnak bizonyult búza deléciós vonalak előállítására (Endo, 1996). Megfigyelték, hogy az egy *Ae. cylindrica* kromoszómát tartalmazó monoszómás addíciós vonalakban a kromoszómák törése, egyes szakaszok deléciója, majd a fragmentumok összeolvadása figyelhető meg az utódokban, amelyekben az *Ae. cylindrica* kromoszóma már nincs jelen (Endo, 1988). Ennek a megfigyelésnek a felhasználásával Endo és Gill (1996) 436 búza deléciós vonalat tudtak C-sávózással kiválogatni, amelyek felhasználhatók a búza kromoszómák fizikai térképezésére. Megfigyelték, hogy az *Ae. cylindrica* mellett az *Ae. triuncialis* L. és az *Ae. speltoides* is tartalmaz gametocid gént. Miller és munkatársai (1982) "Cuckoo" (kakukk) kromoszóma átadódásáról számoltak be az *Aegilops sharonensis* Eig. -el végzett keresztezések utódaiban. Megfigyelték, hogy minden 43 kromoszómaszámú utódban a 4S kromoszóma volt jelen a búza kromoszómák mellett, ezért ezt a kromoszómát kakukk kromoszómának nevezték el. Ugyanezt a jelenséget megfigyelték más *Aegilops* fajoknál is (*Ae. caudata* L. - Endo és Katayama, 1978; *Ae. cylindrica* - Endo, 1979; *Ae. triuncialis* - Endo és Tsunewaki, 1975; *Ae. longissima* Schweinf. & Muschl. - Maan, 1975). Még azokban a keresztezésekben is, ahol sikerült a teljes addíciós sorozatokat előállítani, különböző gyakorisággal adódnak át az egyes kromoszómák az utódokba (Miller, 1983). Saját kísérleteinkben is a búza-árpa keresztezések utódai közt a legnagyobb gyakorisággal a 4H, a legkisebb gyakorisággal az 5H kromoszóma átadódását figyeltük meg (Molnár-Láng és mtsai, 2005) Koba és munkatársai (1991) adataihoz hasonlóan.

Eddig számos *Aegilops* fajjal hoztak létre addíciós vonalakat (Shepherd és Islam, 1988).

Diploid *Aegilops* fajokkal létrehozott addíciós vonalak:

Chinese Spring - *Aegilops umbellulata* ($2n = 2x = 14$, UU) (Kimber, 1967; Friebe és mtsai, 1995a)

Chinese Spring - *Ae. comosa* (2M), ($2n = 2x = 14$, MM) (Riley, 1968)

Chinese Spring - *Ae. mutica* Boiss [szinonima: *Amblyopyrum muticum* (Boiss.) Eig var. *muticum*], ($2n = 2x = 14$, TT) (Dover, 1973)

Chinese Spring - *Ae. longissima* ($2n = 2x = 14$, SS) (Feldman, nem publikált, lásd Shepherd és Islam 1988; Friebe és mtsai, 1993),

Chinese Spring - *Ae. sharonensis* ($2n = 2x = 14$, SS) (Miller és mtsai, 1982),

Holdfast - *Ae. bicornis* (Forssk.) Jaub. & Spach ($2n = 2x = 14$, SS) (Riley és Chapman unpublished, lásd Shepherd és Islam 1988),

Chinese Spring - *Ae. searsii* Feldman & Kislev ex Hammer, ($2n = 2x = 14$, SS) (Pietro és mtsai, 1988; Friebe és mtsai, 1995b)

Chinese Spring - *Ae. speltoides* ($2n = 2x = 14$, SS) (Friebe és mtsai, 2000b),

Tetraploid *Aegilops* fajokkal előállított addíciós vonalak:

Moisson - *Ae. ventricosa* Tausch ($2n = 4x = 28$, DDNN) (Dosba és mtsai, 1978),

Chinese Spring - *Ae. peregrina* Hack. in J. Fraser (szinonima: *Aegilops variabilis*) ($2n = 4x = 28$, UUSS), (Driscoll, 1974; Friebe és mtsai, 1996b),

Chinese Spring - *Ae. geniculata* Roth (szinonima: *Ae. ovata*), ($2n = 4x = 14$, UUMM) (Friebe és mtsai, 1999),

Martonvásári 9 kr1 -*Ae. biuncialis* Vis. ($2n = 4x = 28$, UUMM) (Schneider és mtsai, 2005)

2.4.3. Búza/*Aegilops* transzlokációk

A kecskebúza (*Aegilops*) fajokból eddig már számos rezisztenciagént sikerült átvinni a termesztett búzába. Az első gyakorlati szempontból is jelentős idegen fajú transzlokációt Searsnek (1956) sikerült létrehoznia, aki az *Aegilops umbellulata* levélrozda rezisztenciáját építette be a búzába. Röntgensugárzással az *Ae. umbellulata* 6U és a búza 6B kromoszómája

közt hozott létre idegen fajú transzlokációt. A 6U kromoszóma-szegmentumon lokalizált rezisztenciagént *Lr9*-nek nevezték el, amely aztán a Transfer búzatörzsből több, az USA-ban termesztett őszi búzafajtába (pl. Arthur 71) bekerült. Sajnos 1971-ben ez a gén az új rasszokkal szemben fogékonnyá vált, amely további terjedésének gátat vetett.

A B genommal szoros rokonsági kapcsolatban álló *Aegilops speltoides*-ből több fontos rezisztenciagént vittek át a búzába. Az *Lr28* gént Riley és munkatársai (1968) építették be a búzába. Kísérletükben az *Ae. speltoides* búzával nagyfokú homeológ párosodást mutató vonalát használták fel, amelyből a 4AS.4AL-7S transzlokációt állították elő. Az ebben a transzlokációban azonosított *Lr28* gén kimutatható volt a Sunland búzafajtában, amely Ausztráliában a búzatermesztésben elterjedt. Kísérletükben elsődleges céljuk volt az *Ae. comosa* sárgarozsda rezisztenciájának átvitele, amelynek érdekében a búza-*Ae. comosa* hibrideket az *Ae. speltoides* homeológ párosodást mutató vonalával keresztezték. Később kimutatták, hogy az *Ae. comosa*-ból származó *Yr8* gén mellett az utódokban a *Lr28* gén is jelen van.

Sears homeológ rekombináció indukálásával vitte át az *Sr32* szárrozsdá rezisztenciagént az *Ae. speltoides*-ből (McIntosh, 1991), amelyet később a 2S kromoszómán lokalizáltak. Mindhárom homeológ búza kromoszómával (2A, 2B, 2D) állított elő transzlokációkat, melyek mindegyike tartalmazta a 2S kromoszóma teljes rövid karját és különböző méretű szegmentumokat a homeológ búza kromoszómák hosszú karjából. Ez a transzlokáció a gyakorlatban nem terjedt el (Friebe és mtsai, 1996a). Ugyanebből a fajból több más rezisztenciagént is sikerült a termesztett búzába beépíteni, *Lr35*, *Sr39* (Kerber és Dyck, 1990), *Lr36* (Dvorak, 1977; Dvorak és Knott, 1980, 1990), *Gb5* (Wells és mtsai, 1973), *Pm12* (Miller és mtsai, 1987), amelyek azonban nem kerültek köztermesztésbe.

A *Pm13* lisztharmat rezisztenciagént az *Ae. longissima* fajból Ceoloni és munkatársai (1988) vitték át indukált homeológ párosodás révén a termesztett durum és hexaploid búzába, amely aztán nemesített búza fajtajelöltekbe is bekerült (Ceoloni és mtsai, 1996). Az egyik legjelentősebb, a gyakorlatban is elterjedt búza-*Aegilops* transzlokációt Doussinault és munkatársai (1983) állították elő. Az *Aegilops ventricosa* szemfoltos szártőbetegség (búza szártörő gomba) [*Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Dreighton, szinonima: *Tapesia yallundae*] rezisztenciáját vitték át a termesztett búzába. A *Pch1* gén számos termesztett búzafajtában kimutatható volt és a búza 7DL karján lokalizálták (Jahier és mtsai, 1979). Későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy ez a transzlokáció a *Pch1* gén mellett hordozta a *Sr38*, az *Lr37* és a *Yr17* rezisztenciagéneket is, amelyek szárrozsdával, levélrozsdával és sárgarozsdával szembeni ellenállóságot biztosítottak. Ezek a gének az *Ae. ventricosa* 6M

kromoszómájából származtak és a búza 2A kromoszómájára transzlokálódtak. Az *Ae. ventricosa*-ból származó rozsda rezisztenciagének Ausztráliában több termesztett búzafajtában (Trident, Sunbri) is kimutathatók voltak. Dhaliwal és munkatársai (2002) az *Aegilops ovata* levélrozsda rezisztenciáját építették be a termesztett búzába. Az első lépésben létrehozott 5M(5D) szubsztitúciók rezisztensnek bizonyultak, majd ezekből háromféle transzlokációt állítottak elő, melyek a búza 1BL, 2AL és 5BS és az *Ae. ovata* 5M kromoszómái közt jöttek létre. Az egyik transzlokáció, amely az 5M kromoszóma hosszú karjának csak egy rövid szegmentumát hordozta, ígéretes rezisztencia forrásnak bizonyult nemcsak levél-, de sárgarozsdával szemben is (Aghaee-Sarbarzeh és mtsai, 2002). A rekombinánsokat a citogenetikai módszerek mellett mikroszatellit markerekkel is elemezték. Ugyanez a kutatócsoport az *Aegilops triuncialis* levélrozsda rezisztenciáját is beépítette a búzába (Aghaee-Sarbarzeh és mtsai, 2001). Az *Aegilops umbellulata*-ból a búzába beépített kromoszóma-szegmentumokat, amelyek HMW glutenin egységeket kódoló régiókat hordoztak, Castilho és munkatársai (1996) *in situ* hibridizációval jellemezték. Az *Aegilops variabilis*-ból gyökérgubacsképző fonalféreggel (*Meloidogyne naasi*) szembeni rezisztenciagént vittek át a búzába Barloy és munkatársai (2000). Három RAPD markert azonosítottak, amelyek ehhez a rezisztencia génhez kapcsolódtak, így alkalmasak lehetnek a továbbiakban marker alapú szelekcióra.

2.4.4. Az *Aegilops biuncialis* Vis.

Az *Aegilops biuncialis* Vis. [szinonima: *Aegilops lorentii* Hochst., *Triticum macrochaetum* (Shuttlew. & A. Huet ex Duval-Jouve) K. Richter] ($2n = 4x = 28$, $U^bU^bM^bM^b$) az *Aegilops* nemzetség *Polyeides* szekciójába tartozó tetraploid faj. Az *Aegilops biuncialis* U és M genommal rendelkezik az *Aegilops geniculata* Roth. ($2n = 28 = U^gU^gM^gM^g$), az *Aegilops columnaris* Zhuk. ($2n = 28 = U^{co}U^{co}M^{co}M^{co}$), és az *Aegilops neglecta* Req Ex Bertol. ($2n = 28 = U^nU^nM^nM^n$) fajokhoz hasonlóan. Az U^b genom őse a diploid *Aegilops umbellulata* (szinonima: *Triticum umbellulatum*) Zhuk. ($2n = 2x = 14$, UU), míg a módosult M^b genom az *Aegilops comosa* (szinonima: *Triticum comosum* (Sm. In Sibth. & Sm.) ($2n = 2x = 14$, MM) fajból ered (Kimber és Sears, 1983; Resta és mtsai, 1996; Badaeva és mtsai, 2004). A poliploid fajok és az *Aegilops umbellulata* közt létrehozott hibridek meiotikus párosodási vizsgálatai alapján megállapították, hogy a poliploidok U genomja a diploid *Ae. umbellulata*-ból ered (Feldman, 1965).

Az *Ae. biuncialis* a mediterrán és a Nyugat-Ázsiai régiókban fordul elő, sokszor száraz területeken (évi csapadék 225-800 mm), de fellelhető csapadékos tájékokon is (1250 mm évi csapadék) (van Slageren, 1994). Az *Ae. biuncialis* nagyfokú genetikai variabilitása többek közt abból is eredhet, hogy a legváltozatosabb környezetben fordul elő és ezzel magyarázható egyes vonalainak jó szárazságtűrése is (Molnár és mtsai, 2004). Az *Ae. biuncialis* egyes vonalainak az árpa sárga törpeség vírussal (Makkouk és mtsai, 1994), a sárga rozsdával (Damania és Pecetti, 1990) és a levélrozsdával (Dimov és mtsai, 1993) szembeni rezisztenciájáról már többen beszámoltak. Számos *Aegilops* fajból hoztak már létre addíciós vonalakat, kedvező agronómiai tulajdonságokkal rendelkező transzlokációkat, de ilyen genetikai anyagokról az *Ae. biuncialis* felhasználásával még nem számoltak be. Ezért Martonvásáron célul tűztük ki új genetikai alapanyagok előállítását az *Ae. biuncialis* felhasználásával, melynek végső célja az *Ae. biuncialis* kedvező biotikus és abiotikus rezisztenciájának beépítése a termesztett búzába.

2.5. Kromoszóma azonosítás a hibridekben és származékaikban molekuláris citogenetikai és genetikai módszerekkel

2.5.1. Kromoszómák azonosítása sávozással, Giemsa festés

A kromoszómák morfológiai jellemzői alapján (kromoszómák mérete, kararányok, szatellit megléte) a gabonafélék egyes kromoszómái nem azonosíthatók, ezért különböző módszereket dolgoztak ki azok pontos felismerésének érdekében. Először Caspersson és munkatársai figyelték meg 1968-ban, ha a kromoszómákat kinakrin (Quinacrin) mustárral festik meg, akkor ultraibolya fény alatt a kromoszómákon jellegzetes fluoreszkáló sávok jelennek meg. Ennek alapján dolgozták ki a Q-sávok festési technikát. Nem sokkal később, az első *in situ* hibridizációs kísérletben Gall és Pardue (1969) kontrasztfestékként Giemsa festéket alkalmazva azt tapasztalták, hogy a kromoszómák denaturációja, majd renaturációja után a centroméra közelében intenzíven festődő sávok jelentek meg. Ennek a megfigyelésnek alapján dolgozták ki a későbbiekben a különböző Giemsa festési eljárásokat, amelyek közül a legelterjedtebb a növényeken a C-sávok festési technika, amelynek elnevezése abból fakad, hogy elsősorban a konstitutív (constitutive) heterokromatint festi (Friebe és Gill, 1996).

Giemsa festéssel kezdetben a humán kromoszómák azonosítását oldották meg (Sumner és mtsai, 1971; Anonymous, 1972), de rövidesen sikeresen alkalmazták a módszert az egér és más állatfajok kromoszómáinak elemzésére is. A növények közül elsősorban a

rendkívül nagy kromoszómákkal rendelkező *Vicia faba* L. elemzését végezték el (Vosa és Marchi, 1972; Takehisa és Utsumi, 1973), majd rövidesen kidolgozták a rozs kariotípusát (Sarma és Natarajan, 1973; Vosa, 1974; Gill és Kimber, 1974a; Weimark, 1974). A módszert ezután széles körben felhasználták búza-rozs hibridek, amfidiploidok, transzlokációk elemzésére, azonosítására (Merker, 1973; Lukaszewski és Gustafson, 1983). Magyarországon Hadlaczký és Belea már 1975-ben sikeresen alkalmazta a Giemsa festést, mellyel bizonyították, hogy az *Aegilops speltoides* S genomja nem lehet a búza B genomjának közvetlen donorja, azaz az *Ae. speltoides* kromoszómáinak C-sáv mintázata nem azonos a *T. turgidum* B kromoszómáinak mintázatával.

A búza kromoszómák Giemsa festésen alapuló C-sáv standard kariotípusát Gill és munkatársai 1991-ben közzölték, összegezve az ezen a területen a 70-es évek elejétől született eredményeket (Gill és Kimber, 1974b; Natarajan és Sarma, 1974; Zurabishvili és mtsai, 1974; Hadlaczký és Belea, 1975; Lukaszewski és Gustafson, 1983; Endo és Gill, 1984). A Chinese Spring búzafajtára kidolgozott C-sáv kariotípustól azonban a különböző búzafajtákon eltérések tapasztalhatók, amelyek megnehezítik az egyes kromoszómák felismerését (Iordansky és mtsai, 1978; Endo és Gill, 1984; Friebe és Gill, 1994). Az előforduló eltérések ismeretében azonban megfelelő gyakorlattal az egyes kromoszómák C-sávazással azonosíthatóak. A rozsnál és a búzánál sokkal nehezebb feladat az árpa kromoszómáinak megkülönböztetése Giemsa festéssel.

Az árpa kromoszómák Giemsa festéssel való azonosítását elsősorban Linde-Laursen (1975) és munkatársai (Linde-Laursen és mtsai, 1982) dolgozták ki. Az árpa kromoszómák általában sokkal gyengébben festődnek, mint a rozs vagy a búza kromoszómák és a sávok többnyire a centromérák körül figyelhetők meg. A C-sávazás mellett több szerző sikerrel alkalmazta az N-sávazást az árpa kromoszómák azonosítására (Islam, 1980; Kakeda és mtsai, 1991). Míg C-sávazással a búza minden egyes kromoszómája megkülönböztethető, addig N-sávazással a 21 kromoszómából kezdetben 9 (Gerlach, 1977), később 16 kromoszómát tudtak azonosítani (Gill és mtsai, 1991). Az N-sávazás az előkezelésekben különbözik a C-sávazástól. A búza/árpa addíciós vonalak azonosítására Islam (1980) sikeresen alkalmazta az N-sávazást, ezzel a módszerrel jobban el tudta különíteni egymástól a búza és az árpa kromoszómákat, és az árpa minden egyes kromoszómája is felismerhető volt.

A búza rokonsági körébe tartozó vad fajok közül a kecskebúza (*Aegilops*) fajok egyes kromoszómáinak részletes C-sáv azonosítását elsősorban Friebe és munkatársai (1993, 1995a,b, 1996b, 1999) végezték el.

A Giemsa festési eljárások hátránya azonban, hogy eredményességüket több tényező erősen befolyásolja (a kereskedelemben kapható festék minősége, a preparátum tisztasága) és a kapott sávok kiértékeléséhez is rendkívül nagy gyakorlat szükséges. Előnyük azonban gyorsaságuk és olcsóságuk.

2.5.2. *In situ* hibridizáció

A biológiai preparátumokon a DNS vagy RNS szekvenciák lokalizálására kidolgozott *in situ* hibridizációs technikák (Gall és Pardue, 1969) bár költségesebbek és bonyolultabbak, a kromoszómák azonosítását mégis jelentősen megkönnyítik. Az egyes kromoszómákon különböző repetitív DNS szekvenciákkal végzett *in situ* hibridizáció után a kapott jelek sokszor olyan komplex mintázatot adnak, amelyek a kromoszómák azonosítását egyértelművé teszik. Az első *in situ* hibridizációs technikák izotópokat alkalmaztak a próbák jelölésére, azonban az izotópos jelek hosszadalmas rögzítése és a munka veszélyessége miatt ezek használata később visszaszorult. Elterjedt a biotin és a digoxigenin használata a DNS szekvenciák jelölésére (Langer-Safer és mtsai, 1982), sőt később közvetlenül a fluorokrómokkal jelölt nukleotidokat építették be a próbákba (Jiang és Gill, 1994). A fluorokrómok használatára alapozott *in situ* hibridizációt, amely lehetővé tette a hibridizációs jelek fluoreszcens mikroszkópban való könnyű detektálhatóságát, fluoreszcens *in situ* hibridizációnak (FISH) nevezték el (Leitch és mtsai, 1994). A FISH során a fluorokróмокat közvetlen vagy közvetett jelölésben is felhasználhatják, az utóbbi esetben a detektálás több lépésben történik és a hibridizációs jel végül felerősödik, így a módszer érzékenyebb (Leitch és mtsai, 1994). Az első növényeken végzett nem izotópos *in situ* hibridizáció során megfigyelték, hogy a biotinnal jelölt, 120 bp hosszú, rozs ismétlődő szekvencia búza kromoszómákon adott hibridizációs mintázata alapján az összes B kromoszóma, de egy-két A és D kromoszóma is beazonosítható volt (Rayburn és Gill, 1985). Egy másik, az *Aegilops tauschii*-ből származó ismétlődő szekvenciával végzett *in situ* hibridizáció után az összes D kromoszóma felismerhető lett (Rayburn és Gill, 1986b). A két próba egyidejű alkalmazásakor, azok különböző színű fluorokrómokkal végzett jelölése után megfigyelték, hogy a 21 pár búza kromoszómából 17 azonosítható (Mukai és mtsai, 1993b). A módszert „multicolor FISH”-nek nevezték el, azaz „többszínű fluoreszcens *in situ* hibridizációnak”. 1997-ben Pedersen és Langridge másik két DNS szekvencia kombinálásával mind a 21 pár búza kromoszómát egyértelműen meg tudta különböztetni egymástól. A búza mellett a megfelelő repetitív DNS szekvenciák alkalmazásával a rokon fajok jelentős hányadának

(árpa, rozs, egyes *Aegilops* fajok) FISH kariotípusát is leírták (Pedersen és mtsai, 1996; Lapitan és mtsai, 1986; Badaeva és mtsai, 1996a, b, 2002, 2004; Linc és mtsai, 1999).

Az *in situ* hibridizáció a kromoszómák azonosításán túl rendkívül sok területen felhasználható. A módszer alkalmas arra, hogy nukleinsav szekvenciákat (DNS vagy RNS) a biológiai anyagban, a sejten belül (citoplazmában, sejtalkotókban vagy kromoszómákon) kimutassunk. Az *in situ* hibridizáció alapvetően abban különbözik más DNS hibridizációs technikáktól, hogy a vizsgálni kívánt szekvenciát a sejten belül „*in situ*” mutatjuk ki, és nem egy membránra felvitt, izolált DNS-hez hibridizálunk. Az *in situ* hibridizáció alkalmas a kromoszómák fizikai térképének elkészítésére, a kromoszómák szerkezeti megváltozásainak elemzésére, a kromoszómák és genomok evolúciójának és működésének vizsgálatára, a génexpresszió tanulmányozására, a szövetekben vírusok és baktériumok kimutatására, a transzformált szekvenciák kimutatására. Az *in situ* hibridizációban a legnehezebb és a legizgalmasabb feladat az egyedi gének kimutatása, melynek elsősorban a módszer érzékenysége szab gátat (de Jong és mtsai, 1999). Az első egyedi gén kimutatásáról Harper és Saunders (1981) számoltak be, akik az inzulin gént mutatták ki az 1-es humán kromoszómán radioaktívan jelölt próbák segítségével. Növényeknél csak elszórtan jelentek meg publikációk egyedi gének kimutatására és ezek is többnyire nehezen vagy nem voltak reprodukálhatók (Leitch és Heslop-Harrison, 1993; Abbo és mtsai, 1993). Áttörést jelentett az egyedi szekvenciák kimutatásában a FISH érzékenységének fokozása, melyet elsősorban a kromoszóma-DNS kinyújtásával értek el, ezáltal DNS-szálakat, „fibereket” létrehozva, amelyeken végezték a továbbiakban a hibridizációt. Ezzel a módszerrel sikerült Yamamotonak és Mukainak (2005) a rozsban a szekalin lókuszt pontosan kimutatni. Fransz és munkatársai (1996) sikeresen alkalmazták a módszert a lúdfű (*Arabidopsis*) és a paradicsom kromoszómáin egyedi gének kimutatására. A kinyújtott DNS-szálak rendkívüli hosszúsága miatt azonban ez a módszer sem terjedt el olyan mértékben mint azt korábban várták, inkább a metafázisos kromoszómáknál sokkal hosszabb, de még követhető pachitén kromoszómák elemzésével értek el új eredményeket Cheng és munkatársai (2001) a rizsben, Fransz és munkatársai (2000) a lúdfűben. A búza citogenetikai kutatásokban új lehetőséget nyújt az áramlási citométerrel szétválogatott kromoszómákból kialakított, megnyújtott „superstretched” kromoszómák vizsgálata (Valárik és mtsai, 2004). Ezzel a módszerrel a metafázisban megfigyelhető kondenzált kromoszómák hosszának százszorosára nyújthatók a kromoszómák. Így a kimutatható DNS-szekvencia hossza akár 1 kbp-ra is csökkenhet.

Az egyedi szekvenciák kimutatására szolgáló törekvések mellett a legtöbb eredmény inkább az ismétlődő szekvenciák térképezése során született (Rayburn és Gill, 1985, 1986b;

Lapitan és mtsai, 1989; Maluszynska és Heslop-Harrison, 1991; Jiang és Gill, 1994). Sikeresen térképezték a növényi kromoszómákon a sok kópiával rendelkező riboszómális 5S és 18S.26S géncsaládokat (Mukai és mtsai, 1990, 1991a). Próbálkozások történtek SSR markerekből új FISH próbák előállítására is (Cuadrado és mtsai, 2000).

A faj- és nemzetséghibridek és származékaik vizsgálatában különösen nagy jelentőségre tett szert a GISH módszerének kidolgozása (Schwarzacher és mtsai, 1989; Le és mtsai, 1989). A módszer lényege, hogy a szülőpartnerek teljes genomi DNS-ét használják próbaként, és ezt hibridizálva a preparátumokra a különböző fajokból származó kromoszómák eltérő színekre festődnek. Ezzel a módszerrel az idegen fajú transzlokációkban a beépült kromoszóma-szegmentum mérete és a transzlokációs töréspont elhelyezkedése is pontosan meghatározható. Búza-árpa transzlokációkban a beépült árpa kromoszómák méretét, a transzlokációs töréspontok elhelyezkedését ezzel a módszerrel mutatták ki a martonvásári Molekuláris Citogenetika csoport munkatársai (Molnár-Láng és mtsai, 2000a; D. Nagy és mtsai, 2002). A módszer alkalmas a faj- és nemzetséghibridekben a kromoszóma párosodások elemzésére is (King és mtsai, 1994). A búza és az árpa kromoszómák párosodását demonstrálták búza-árpa hibridek meióziséban GISH-sel Molnár-Láng és munkatársai Martonvásáron (Molnár-Láng és mtsai, 2000b). A búza és az *Aegilops biuncialis* közötti szoros rokonsági kapcsolat miatt e két faj kromoszómainak egymástól való megkülönböztetése GISH-sel sokkal nehezebb feladat mint a búzától genetikailag lényegesen távolabb álló árpáé. A GISH egyes tényezőinek részletes módosítása után sikerült a martonvásári kutatóknak adaptálniuk a módszert a búza és az *Ae. biuncialis* kromoszómák megkülönböztetésére (Molnár és mtsai, 2005). Ezzel a technikával megállapították, hogy a létrehozott búza/*Ae. biuncialis* diszómás addíciós vonalakban nem történtek átrendeződések a búza és az *Ae. biuncialis* kromoszómák közt (Schneider és mtsai, 2005).

2.5.3. Molekuláris markerek felhasználása az idegen fajú kromoszómák azonosítására

A genetikai anyagokba beépült idegen fajú kromoszómák (szegmentumok) kimutatása és azonosítása a citológiai módszerek mellett ma már molekuláris markerekkel is lehetséges (Fedak, 1998). A rokon fajokból származó kromoszóma-szegmentumok közül elsőként az *Ae. umbellulata*-ból a búzába beépült *Lr9* gént hordozó szakaszhoz kapcsolódó molekuláris markert írták le (Schachermayr és mtsai, 1994). Később számos idegen faji eredetű rezisztencia gén nyomon követése vált lehetségessé molekuláris markerek segítségével (Autrique és mtsai, 1995; Bommenini és mtsai, 1997). A búzán ma már több mint 700

mikroszatellit marker térképezéséről számoltak be (Bryan és mtsai, 1997; Röder és mtsai, 1998; Pestsova és mtsai, 2000), sőt a magántulajdonú intézetekben a térképezett mikroszatellit markerek száma a 2000-et is meghaladja (Monsanto, Cambridge, Nagy-Britannia, 2002, szóbeli közlés), azonban az utóbbi adatok nem hozzáférhetők. Az *Aegilops* fajokról eddig nem készültek részletes mikroszatellit térképek, de a búza mikroszatellit markerek az *Aegilops* fajok kromoszómáinak kimutatására felhasználhatók, amennyiben azokon polimorf terméket adnak (Salina és mtsai, 2001; Pestsova és mtsai, 2002). Az *Aegilops umbellulata*-ból, az *Ae. speltoides*-ből, az *Ae. cylindrica*-ból, az *Ae. tauschii*-ből, az *Ae. ventricosa*-ból a termesztett búzába beépített rezisztenciagének kimutatására különböző PCR alapú molekuláris markerek azonosításáról számoltak be (Gupta és mtsai, 2005; Seah és mtsai, 2001; Helguera és mtsai, 2003; Weng és mtsai, 2005; Adonina és mtsai, 2004; Singh és mtsai, 2004). A rozs (Korzun és mtsai, 2001; Ma és mtsai, 2001) és az árpa kromoszómáin (Ramsay és mtsai, 2000; Li és mtsai, 2003) a búzához hasonlóan számos mikroszatellit markert térképeztek, amelyek felhasználhatók az ezekből a fajokból származó transzlokációk kimutatására (Hernandez és mtsai, 2002). A termesztett búzafajták jelentős hányadában jelenlevő 1RS rozs kromoszómakar molekuláris markerekkel jól kimutatható (Hsam és mtsai, 2000; D. Nagy és Lelley, 2003; Purnhauser és mtsai, 2000). A Martonvásáron előállított búza/árpa transzlokációkban az árpa kromoszóma-szegmentumok méretét GISH-sel határozták meg, de az egyes árpa kromoszóma-szegmentumok azonosítását molekuláris markerek segítségével végezték (D. Nagy és mtsai, 2002). A jövőben várhatóan az új genetikai alapanyagok vizsgálatokor a molekuláris citogenetikai módszerek mellett a molekuláris markerek használata egyre általánosabbá válik.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

3.1.1. Növényi anyagok

Búzafajták, búza genetikai alapanyagok (Triticum aestivum L.)

Martonvásári 9 *kr1* (Mv9 *kr1*) búzatörzs, amelynek létrehozásához a Chinese Spring tavaszi búzafajtából a Martonvásári 9 őszi búzafajtába beépítettük a *kr1* gént, és így *kr1kr1kr2kr2* génösszetételű (Molnár-Láng és mtsai, 1996)

Asakaze komugi, vad fajokkal jól kereszteződő japán búzafajta (fakultatív típusú)

Chinese Spring (kínai, tavaszi búzafajta)

CO4-1, az *Ae. speltoides* (Tausch) *Ph¹* génjét hordozó búza genotípus, amelyet a Chinese Springből hoztak létre (Chen és mtsai, 1994)

Mv Matador 1RS.1BL transzlokációt hordozó magyar őszi búzafajta

Árpafajták (Hordeum vulgare L.)

Betzes (német, kétsoros, tavaszi),

Igri (német, kétsoros, őszi)

Osznova, Manasz (ukrán, hatsoros, őszi)

Martonvásári 37, Martonvásári 38 (magyar, négysoros, őszi),

Kompolti korai, Botond (magyar, hatsoros, őszi)

Attila (német, hatsoros, őszi)

Swift (német, kétsoros, őszi)

Duet (angol, kétsoros, őszi)

NRPB 87-5685 (francia, hatsoros, őszi)

P-284-90 (osztrák, hatsoros, őszi)

Intro, Trasco (holland, kétsoros, őszi)

Martonvásári 50 (magyar, kétsoros, tavaszi)

Kaliforniai Mariout (amerikai, kétsoros, tavaszi)

Rozsfajták (Secale cereale. L.)

Lovászpatonai (magyar, őszi)

Merkator (őszi, német)

Aegilops fajok

Aegilops biuncialis Vis. MvGB 642, amelyet az ICARDA Génbankból, Szíriából (száma: 400940) kaptunk

3.2. Módszerek

3.2.1. Növénynevelés, megporzások, embriókultúra és *in vitro* szaporítás

Keresztezések

A búza × árpa megporzáshoz a növényeket tenyészkertben neveltük fel és a megporzásokat levágott kalászokon a martonvásári fitotronban (PGR kamra, Conviron, Kanada) végeztük. Anyai partnerként az Mv9 kr1 búzatörzset, az Asakaze komugi és a Chinese Spring búzafajtákat, megporzóként a növényi anyagok közt felsorolt árpafajtákat használtuk (Betzes, Igri, Osznova, Manasz, Martonvásári 37, Martonvásári 38, Kompolti korai, Botond, Attila, Swift, Duet, NRPB 87-5685, P-284-90, Intro, Trasco, Martonvásári 50, Kaliforniai Mariout). A levágott búza kalászokat hordozó szárazakat fitotronban 1%-os Volldünger (Agrolinz AG, Ausztria) oldatba állítottuk. Az oldatot 2-3 naponként frissre cseréltük. A kalászokat kasztráltuk, a megporzásokat pörgetéssel végeztük. Minden kombinációban legalább 5-5 kalászt megporoztunk, de az ígéretes kombinációkban a megporzott kalászok száma a 100-at is elérte. A megporzás utáni napon az oldatot az első évben 75 ppm GA₃ (gibberellin sav), a második évtől kezdve 20 ppm 2,4-D-vel (2,4-diklórfenoxi-ecetsavval) kiegészítettük. A kalászokat az embriók kipreparálásáig állandó, +20°C-os hőmérsékleten tartottuk. A megvilágítás napi 16 óra, a megvilágítás intenzitása 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a relatív páratartalom 80% volt.

A búza × rozs keresztezéseket Martonvásáron üvegházban végeztük. Az Mv9 kr1 búzatörzs kalászeit kasztráltuk és rozssal pörgetéssel megporoztuk. A megporzásokat 1994

február-március hónapokban végeztük, amikor a megporzások szempontjából az üvegházban a hőmérséklet optimális, kb. 20-22 °C volt.

A búza \times *Aegilops biuncialis* hibrideket Martonvásáron 1995-ben tenyészkertben állítottuk elő. Az Mv9kr1 kalászeit kasztráltuk és azokat az *Aegilops biuncialis*-sal (MvGB642) pörgetéssel megporoztuk. A búza-rozs és a búza \times *Ae. biuncialis* hibridek előállításához embriókultúrát nem alkalmaztunk.

A búza \times árpa hibridek búzával való visszakeresztezését a hibrid növényeken a martonvásári fitotronban (Convion, PGV kamra) végeztük. A hibridek kalászeit kasztráltuk, a megporzást pörgetéssel végeztük, +20°C-os hőmérsékleten, 80%-os relatív páratartalom mellett. A megporzás után másnap 100 ppm 2,4-D-t injektáltunk a szárba, a két felső nódusz közé, a sebzés helyét vazelinnel leragasztottuk. Az embriókat megporzás után három héttel kiparagoltuk és *in vitro* neveltük fel.

A búza \times *Aegilops biuncialis* hibridek, búza \times rozs amfidiploidok búzával való visszakeresztezését a fent leírtakhoz hasonlóan végeztük fitotronban, de ezekben a kombinációkban nem alkalmaztunk 2,4 D kezelést és embriókultúrát sem.

Embriókultúra

A búza \times árpa keresztezésekből, illetve a búza \times árpa hibridek búzával való visszakeresztezéséből származó embriókat megporzás után három héttel a fejlődő szemekből kimetszettük és *in vitro* neveltük fel. A kisméretű, differenciálatlan embriókat módosított Norstog táptalajra (Taira és Larter, 1977), a nagyobb, fejlettebb embriókat B₅ (Gamborg és mtsai, 1968) táptalajra helyeztük. Az embriókat kezdetben sötétben, +20°C-on inkubátorban tartottuk, majd kb. 1 hét múlva a csírázás megindulása után fényre (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) tettük. A táptalajon fejlődő növénykéket vernalizáltuk (6 hét, +4°C), majd talajba ültettük és fitotronban felneveltük.

Növénynevelés

A búza \times árpa, búza \times *Aegilops biuncialis* hibrideket, búza \times rozs amfidiploidokat, a szövettényészetben regenerált hibrideket, ezeknek meghatározott kromoszómaszámú, búzával visszakeresztezett utódait és az azonosított addíciós vonalakat általában fitotronban neveltük fel (Convion, PGR kamra). A növényeket bokrosodásig nappal +15°C, éjjel +10°C-os hőmérsékleten, rövid nappalon, 12 órás megvilágítás mellett neveltük. Bokrosodás után a

hőmérsékletet 2°C-kal megemeltük, a megvilágítást 14 órára növeltük. Szárbaindulás után a hőmérsékletet nappal +19°C, éjjel +14°C-ra emeltük, a megvilágítás 16 óra lett. Virágzáskor a hőmérsékletet +20°C-ra állítottuk be, majd a szemfejlődés kezdetén a hőmérsékletet 2°C-kal emeltük. A fitotronban felnevelt, meghatározott kromoszómaszámú és összetételű növényeket egyenként learattuk, részletesen megmértük (növénymagasság, kaláshossz, kalászka/főkalász, szem/kalász) és a szemeket a magtárolóban helyeztük el +4°C-on.

Kolchicinkezelés

Néhány hibridet (Mv9 kr1 × *Aegilops biuncialis*) a bokrosodási fázisban kolchicinnel (Sigma) kezeltünk. A növényeket a földből kiemeltük, a gyökereket 4-5 cm hosszúságúra visszavágtuk és 0,04%-os kolchicin oldatba tettük 5 órára, +15°C-ra. Utána legalább 1,5 órán keresztül a gyökereket csapvízben mostuk, majd a növényeket talajba visszaültettük. A leveleket ültetés után visszavágtuk.

In vitro szaporítás

A steril, de jól bokrosodó búza × árpa hibridek (Mv9 kr1 × Igri, Asakaze komugi × Manasz) fiatal, 1-2 cm hosszú kalászkezdeményeit táptalajra helyezve a Galiba és munkatársai (1986) által leírt módon elkalluszosítottuk. A sterilizált kalászkezdeményeket a Sears és Deckard (1982) által módosított MS táptalajra (Murashige és Skoog, 1962) helyeztük, amelybe 1 mg/l 2,4-D-t adtunk. A 2,4 D koncentrációt egy hónap elteltével fokozatosan csökkentettük (0,5; 0,1; 0 mg/l), majd a növénykéket talajba ültettük.

Tenyészkerti kísérletek

A búza/árpa, búza/*Ae. biuncialis*, búza/rozs amfidiploidokat, addíciós és transzlokációs vonalakat, továbbá a szülőpartnereket több éven keresztül tenyészkertben elvetettük (Martonvásár, Tükrös). Egy-egy genotípusból az adott anyagból elérhető szemek mennyiségének megfelelően 10-20 sort vetettünk (10 szem/1m-es sor). A tenyészkertben egyrészt szaporítottuk a különböző genetikai anyagokat, másrészt megfigyeléseket végeztünk. Vizsgáltuk a különböző morfológiai tulajdonságokat, betegségek (levélrozsda, lisztharmat, *Helminthosporium*, árpa sárga törpeség vírus) megjelenését, kalácsolási időt. A különböző genetikai anyagokból 10-10 növényt részletesen megmértünk (növénymagasság, kaláshossz,

kalászká/főkalász, szem/kalász), a többi anyagot pedig learattuk, hogy a további vizsgálatokhoz megfelelő számú szemmel rendelkezünk.

3.2.2. Citológiai vizsgálatok (Feulgen módszer és *in situ* hibridizáció)

3.2.2.1. Preparátumkészítés

A Petri csészébe, szűrőpapírra helyezett szemekre annyi csapvizet öntöttünk, amennyi azokat éppen ellepte. Másnap reggel a vizet leöntöttük és a szemeket szobahőmérsékleten csíráztattuk. A beáztatott és felpattant szemeket 48-72 órára +4°C-ra helyeztük. A hidegkezelés után a szemeket 26 órára +25°C-os inkubátorba tettük. A kicsírázott szemekről a többnyire 1,5-2 cm-es gyökereket jeges vízben (0°C) rögzítettük, 24 órán át. A hidegkezelés után a gyökércsúcsokat abszolút etilalkohol és jégcet 3:1 arányú keverékében fixáltuk, majd +4°C-on tároltuk.

In situ hibridizációra alkalmas preparátum készítéséhez a fixált gyökércsúcsokat kármínecetsav 1%-os oldatába helyeztük 10 percre. A gyökércsúcsokat ecetsav 45%-os oldatában nyomtuk szét, majd a tárgylemezeket fénymikroszkóppal, fáziskontraszt feltét alatt vizsgáltuk. Az *in situ* hibridizációhoz alkalmas, sok metafázisban lévő osztódó sejtet tartalmazó tárgylemezekről a fedőlemezt folyékony N₂-ben pattintottuk le. A tárgylemezeket -20°C-on tároltuk felhasználásig.

Meiotikus preparátumok készítéséhez a különböző genetikai anyagokból portokokat gyűjtöttünk, amelyeket abszolút etilalkohol és jégcet 3:1 arányú keverékében rögzítettünk. Néhány óra elteltével az oldatot 70%-os etilalkoholra cseréltük. A preparátumok készítéséhez a portokokat 45%-os ecetsavban nyomtuk szét. Csak azokat a tárgylemezeket válogattuk ki, és használtuk fel a későbbiekben, amelyeken kellő számú sejt volt a meiózis I. metafázisában és a kromoszómák jól szétterültek, nem fedték egymást. A tárgylemezekről a fedőlemezt folyékony N₂-ben fagyasztottuk és pattintottuk le, majd a lemezeket -20°C-on tároltuk felhasználásig.

3.2.2.2. Feulgen festés

1. A vizsgálandó gyökereket, portokokat - a fixáló oldat eltávolítása után - 1N HCl oldatban hidrolizáltuk +60°C-on 11-14 percig, majd bázikus fuxinban festettük min. 20-30 percig.

2. A megfestett gyökércsúcsokból dörzspreparátumokat készítettünk és fénymikroszkóp alatt számoltuk a kromoszómákat.

3.2.2.3. *In situ* hibridizáció

DNS próbák

A pAs1 DNS klón *Ae. tauschii*-ből izolált és pUC8 plazmidba inzertált 1kb hosszúságú repetitív, nem kódoló DNS szekvenciát hordozó fragmentum (Rayburn és Gill, 1986a).

A pSc119.2 DNS próba 120 bp hosszúságú, rozsból izolált repetitív szekvenciákat hordozó DNS szakasz, amelyet a pBR322 plazmidba építettek be (Bedbrook és mtsai, 1980).

A HvT01 szubtelomérás ismétlődő DNS szekvenciát a teljes genomi árpa DNS-ből PCR-rel a 5'CGAAACTCGCATTTTGGCC3' és a 5'AGAGTTCCCGTAACCGGCCCC3' primerek segítségével szaporítottuk fel (Schubert és mtsai, 1998).

A GAA szatellit trinukleotid szekvenciát a teljes árpa genomi DNS-ből PCR-rel a (GAA)₇ és a (CTT)₇ primerek felhasználásával szaporítottuk fel (Vrána és mtsai, 2000).

A pTa71 DNS klón 9.05 kb hosszúságú, a búza riboszómális génjeinek egy-egy szakaszát hordozza (18S, 5.8S és 25S rDNS) a pUC19 vektorba klónozva (Gerlach és Bedbrook, 1979).

Nick transzláció - próba jelölése fluorokrómmal

A GISH-hez próbaként használt árpa DNS-t Sau3AI restrikciós enzimmal hasítottuk, majd később a rozs és az árpa DNS-t is szonikátorral (Branson Digital Sonifer S-250D, USA) fragmentáltuk. A FISH-hez próbaként alkalmazott pTa71, pAs1 és pSc119.2 DNS klónokhoz hasonlóan a fragmentált, különböző fajokból származó DNS mintákat Fluorogreennel (fluorescein-11-dUTP, Amersham; fluorescein-12-dUTP, Roche), illetve Fluororeddel (rhodamin-4-dUTP, Amersham; rhodamine-5-dUTP, Roche) jelöltük nick transzlációval.

1. Egy steril, alufóliával borított, 1,5 ml-es eppendorfcsőbe pipettáztuk a szükséges puffereket és összetevőket: 10×NT puffer, jelöletlen nukleotid keverék, fluorokrómmal jelölt nukleotid, 100 mM dithiothreitol, 1 µg jelöletlen - előzőleg fragmentált DNS. A mennyiséget 45 µl-re egészítettük ki steril vízzel.

2. Hozzáadtunk 5 µl DNS polimeráz I/DNáz I (GIBCO) enzimoldatot, majd centrifugáltuk.
3. Az eppendorfcsővet +15°C-on inkubáltuk 3 és fél órán keresztül.
4. A kezelés után hozzáadtunk 5 µl 0,3 M EDTA-t (pH 8), a megfelelő mennyiségű - előzőleg fragmentált - blokkoló DNS-t (búza-árpa hibrideknél 40 ×-es, búza-rozs hibrideknél 35 ×-ös mennyiségben), 1/10 térfogat 3 M nátrium-acetát-ot, illetve 2 és fél-3 térfogat abszolút etilalkoholt. Alapos, de óvatos összekeverés után kicsaptuk a DNS-t (-70°C-on fél órán át vagy -20°C-on egy éjszakán át).
5. Az eppendorfcsővet 12 ezer g fordulattal +4°C-on 10-15 percig centrifugáltuk. Leöntöttük a felülúszót, majd 500 µl jéghideg 70%-os etilalkoholt pipettáztunk a kicsapott mintához és a csövet +4°C-ra helyeztük fél órára.
6. +4°C-on, 4 percig, 12 ezer g fordulattal történt centrifugálás után leöntöttük a felülúszót és a csapadékot éjszakán át kiszárítottuk.
7. A jelölt DNS-hez 20 µl 1×TE puffert adtunk, majd -20°C-on tároltuk.

Próba jelölése PCR reakcióval

A HvT01 szubtelomérás repetitív szekvencia és a GAA trinukleotid DNS próbák felszaporítását és fluorokrómmal való jelölését PCR-készülékben (Eppendorf MasterCycler 5333, Eppendorf AG, Németország) végeztük el. A próbák felszaporítása árpa (*H. vulgare* L.) genomi DNS-ből történt, a jelöléshez a felszaporított DNS templátokat használtuk (Vrána és mtsai, 2000). A PCR reakció körülményeit Vrána és munkatársai (2000) és Schubert és munkatársai (1998) leírásai alapján állítottuk össze.

1. Az 50µl reakciókeverék összetétele a következő volt: 100 ng templát DNS, 1U Taq DNA polimeráz, 1× PCR-puffer, 1 mM MgCl₂, 200 µM dNTP keverék, 1 µM forward primer, 1 µM reverse primer, steril víz. A jelöléshez használt reakciókeverék a felsoroltakon kívül 0,75 nM fluorokrómmal jelölt nukleotidot (Fluorored vagy Fluorogreen) is tartalmazott.
2. A jelölt PCR termékeket 3 M Na-acetát és abszolút etanol keverékében -80°C-on a Nick transzlaciónál leírtakhoz hasonlóan kicsaptuk, jéghideg 70%-os etanolban mostuk, egy éjszakán át szobahőmérsékleten száradni hagytuk, majd 50 µl steril vízben feloldottuk. A próbákat felhasználásig -20°C-on tároltuk.

Genomikus in situ hibridizáció (GISH)

A GISH vizsgálatokat Reader és munkatársai (1994) módszere alapján végeztük, kisebb módosításokat követően.

1. Az *in situ* hibridizációhoz alkalmas tárgylemezeket +37°C-os termosztátban előmelegítettük (kb. 1-2 óra), majd frissen készített 10 µg/ml (w/v) koncentrációjú RNáz oldatba helyeztük fél órára.
2. Fél óra elteltével a tárgylemezeket 2×2 percig +37°C-os 2×SSC oldatban mostuk.
3. A denaturációt megelőzően a kromoszómák fixálásához a preparátumokat 4%-os (w/v) frissen depolimerizált paraformaldehid oldatban kezeltük szobahőmérsékleten 10 percig, majd 3×2 percig 2×SSC oldatban öblítettük őket. Az utolsó mosást követően a tárgylemezeket +37°C-os vízfürdőben előmelegítettük.
4. A preparátumokon a DNS denaturációját 70%-os formamid oldatban végeztük. A tárgylemezeket +70°C-os vízfürdőben inkubáltuk 3 percig, majd a formamid oldatot jéghideg 70%-os etilalkoholra cseréltük, amely kezelést még két alkalommal megismételtünk 2-2 percig. Ezt követően a tárgylemezeket -20°C-on tárolt 90%-os és abszolút etilalkohol oldatokban öblítettük 3, illetve 5 percig, majd levegőn szárítottuk a hibridizációs oldat elkészítéséig.
5. Ötven µl hibridizációs keverék 2×SSC-t, 10% dextrán-szulfátot, 0,2% nátrium-dodecilszulfátot és 1 ng/µl jelölt próba és blokkoló DNS keverékét tartalmazta tárgylemezenként. Az egyes kísérletekben szereplő két faj homológ DNS szekvenciáinak blokkolására jelöletlen DNS-t használtunk, amelyet autoklávozással fragmentáltunk és megfelelő arányban adagoltuk a hibridizációs keverékhez. A jelölt próba és a blokkoló DNS denaturációját forralással végeztük 5 percig, majd az eppendorfcsővet pár percre jégre helyeztük.
6. A forralás következtében elpárolgott mennyiség miatt a tárgylemezekre egyenként 45 µl hibridizációs keveréket cseppentettünk és steril műanyag lappal fedtük le őket.
7. Az *in situ* hibridizációt 2 és fél órán át +65°C-on végeztük, majd 2×SSC pufferben mostuk, illetve hűtöttük a preparátumokat.
8. A szobahőmérsékletűre hűlt tárgylemezeket 4×SSC/0,2%Tween oldatban mostuk a kontrasztfestést megelőzően (a preparátumok éjszakán át tárolhatók az oldatban, amennyiben a folyamatot megszakítjuk).

9. A jelöletlen kromoszómák kontrasztfestése DAPI-val (4'6-diamidino-2-phenylindole, 1 µg/ml) vagy PI-dal (propidium-jodid, 0,5 µg/ml) történt, majd a preparátumokat fakulásgátló (Vectashield, Vector Laboratories) folyadékban fedtük le.

10. A citológiai vizsgálatokat a Zeiss Axioskop 2 plus (Carl Zeiss AG, Németország) epifluoreszcens mikroszkóppal végeztük. A mikroszkópra beszerelt 01-es (DAPI), 10-es (FITC- fluorescein-isothiocyanate), 15-ös (Texas Red, Rhodamin), 25-ös (triple band; DAPI, FITC, Texas Red) filtereket alkalmaztuk a különböző fluoreszcens festékekhez. A felvételeket a Spot CCD (Diagnostic Instruments, USA) kamerával készítettük, a képfeldolgozást, elemzést az Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics, USA) program segítségével végeztük.

A meiotikus preparátumokon a GISH a mitotikus preparátumok hibridizációjához hasonlóan történt, bár ebben az esetben proteináz-K kezelést is alkalmaztunk (Reader és mtsai, 1994). Az RNáz-oldat használata után a sejteket 1-5 ng/ml proteináz-K enzimet tartalmazó PK pufferrel kezeltük +37°C-on 10 percig. Az inkubálás után PK Stop pufferrel leállítottuk az enzim működését, a tárgylemezeket öblítettük és szobahőmérsékletűre hűtöttük (2×2 perc mosás) a paraformaldehid kezeléshez.

Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)

A folyamatot Pickering és munkatársai (1997) módszere alapján hajtottuk végre, az előkezelések a GISH-nél bemutatott módon történtek.

1. A hibridizációs keverék (30 µl/tárgylemez) 50% formamidot, 2×SSC-t, 10% dextrán szulfátot, 0,1% nátrium-dodecil-szulfátot, 50 ng/µl carrier (lazac sperma) DNS-t, valamint 400 pg/µl fluorokrómmal jelölt pSc119.2–pAs1 vagy GAA-HvT01 vagy GAA-pTa71 jelölt DNS próbák keverékét tartalmazta tárgylemezenként.

2. A kromoszóma DNS denaturálását +80°C-on 10 percig (az egyszer már lemosott, újra hibridizált minták esetében 8 percig) hajtottuk végre.

3. Denaturálás után a preparátumokat +37°C-os termosztátba helyeztük át, ahol 6 órán vagy egy éjszakán keresztül végeztük a hibridizációt.

4. A tárgylemezek *in situ* hibridizációt követő mosása a következő volt: 2×SSC-ben +42°C-on 2×5 percig, 25%-os formamid oldatban +42°C-on 2×5 percig végül 2×SSC-ben +42°C-on 3 illetve 5 percig. A preparátumokat az utolsó 2×SSC oldatban szobahőmérsékletűre hűtöttük.

5. Kontrasztfestés előtt a mintákat 4×SSC/0,2% Tween oldatban mostuk.

6. A kromoszómák kontrasztfestését 1 µg/ml DAPI-val végeztük (az újra hibridizált tárgylemezek esetében az oldat koncentrációja 2 µg/ml volt), majd a preparátumokat 4×SSC/0,2% Tween oldatban öblítettük.
7. A minták lefedése és az adatok értékelése a GISH-nél bemutatott módon történt.
8. A hibridizációs jelek rögzítése után a tárgylemezeket 50% formamid és 0,5×SSC keverékében mostuk le a következő hibridizáláshoz.

3.2.3. DNS izolálás

Az alkalmazott molekuláris genetikai és molekuláris citogenetikai módszerekhez felhasznált DNS-t 3-4 hetes növények leveleiből nyertük Sharp és munkatársai (1988) proteináz-K módszere alapján.

1. A fiatal növények leveleiből 3-4 g-ot levágtunk, majd előre lehűtött dörzsmozsarakban, folyékony N₂-ben alaposan porrá dörzsöltük. A levélmintákhoz 17 ml extrakciós puffert és 90 µl proteináz-K enzimet adagoltunk.
2. A mintákat elegyítés után 50 ml-es centrifuga csövekbe töltöttük és +50°C-os vízfürdőben inkubáltuk 1 órán át.
3. Egy óra elteltével a mintákhoz 1 térfogat (17 ml) fenolt (pH 8.0) adtunk, majd a centrifugacsövek forgatásával 10 percig kevertük.
4. Az extraktumokat +4°C-on 15 ezer rpm fordulattal 15 percig centrifugáltuk. A felülúszót új centrifuga csövekbe vittük át, amelyekhez 1 térfogat (17 ml) kloroformot adagoltunk és rázással 10 percig kevertük.
5. A mintákat +4°C-on 12 ezer rpm fordulattal 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót új, steril centrifuga csövekbe pipettáztuk át. Egy térfogat (17 ml) izopropanol hozzáadása után mintáinkat legalább 1 óra hosszat -20°C-on tároltuk.
6. A DNS-t centrifugálással kicsaptuk (+4°C, 8 ezer rpm, 10 perc), papírtörölközön kiszárítottuk (kb. 15-20 perc), majd feloldottuk 1 ml steril vízben. Ezután az egyes mintákhoz 10 µl (10 µg/µl) RNáz-t adagoltunk és +37°C-on, 2 órán át inkubáltuk.
7. Két óra elteltével 4 ml steril vizet és 1 ml 5 M NaCl oldatot pipettáztunk az egyes centrifuga csövekhez (össztérfogat 6 ml). A kloroform:fenol (3-3 ml-t adagoltunk a mintákhoz, 10 percig kevertük rázással, lecentrifugáltuk +4°C-on, 12 ezer rpm fordulattal 10 percig, majd a felülúszót új, steril centrifuga csövekbe vittük át), majd a kloroform (6 ml-t

adtunk az egyes mintákhoz, a többi művelet az előzőekkel megegyezett) tisztítást követően a felülúszót 30 ml-es üveg csövekbe vittük át.

8. A mintákhoz 2 térfogat (12 ml) előzőleg -20°C-on tárolt abszolút etilalkoholt adtunk. Óvatos, de alapos összekeverés után a csöveket -20°C-ra állítottuk legalább egy éjszakára.

9. A kicsapódott DNS-t steril hajlított Pasteur pipettával eltávolítottuk, majd 1 ml 70%-os etilalkoholban mostuk néhány percig.

10. A DNS mintákat kiszárítottuk (legalább 20-30 percig), majd feloldottuk 500 µl steril vízben. Feloldódás után a DNS-t -20°C-on tároltuk.

3.2.4. Mikroszatellit markerek vizsgálata

Ramsay és munkatársainak 2000-ben közölt árpa kapcsoltsági térképéről összesen 51 mikroszatellit markert választottunk ki a csoportunkban előállított búza × árpa hibridek utódaiban az árpa kromoszómák (szegmentumok) eredetének megállapításához, a citológiai azonosítás megerősítéséhez.

Az SSR markerek pontos leírása a következő honlapon megtalálható: <http://www.genetics.org/supplemental/156/4/1997/DC1>. Hat marker (Bmac0399, Bmac0134, HvOLE, Bmag0222, GMS001, Ebmac713) vagy nem adott jelet az árpán, vagy nem volt alkalmas a búza és az árpa kromoszómák megkülönböztetésére. A használt 45 markert az Eredmények fejezetben a 14. táblázatban soroltuk fel. A 45 marker intenzív, a vártnak megfelelő reprodukálható sávokat adott az árpa fajtákban. A PCR reakciót Ramsay és munkatársai (2000) leírása alapján végeztük. A 15 µL reakció keverék 30 ng genomikus DNS-t, 1× PCR puffert, 0,45 U Taq DNS polimerázt (Promega), 0,3 µM (forward és reverse) primereket és 200 µM dNTP-t tartalmazott. A PCR reakciót először a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA), majd az Eppendorf Mastercycler 5333 (Eppendorf AG, Németország) PCR készüléken hajtottuk végre. A PCR reakció körülményeit a megadott Internet honlapon az Appendix S2-ben leírtaknak megfelelően választottuk ki. A PCR terméket 10%-os polyacrylamid gélen (18 × 16 cm) futtattuk gélelektroforézissel. A PCR termék méretét 100 bp DNS-létra (GIBCO) segítségével határoztuk meg. A sávokat Bassam és munkatársai (1991) által közölt ezüst festéssel tettük láthatóvá. A későbbi kísérletekben a PCR-termékeket 1,5%-os agaróz (Sigma) gélen választottuk szét. A sávokat ethidium-bromiddal (Sigma) festettük meg, melynek végkoncentrációja a gélben 1% volt. A DNS-fragmentumok méretét 100 bp DNS-létra (Invitrogen) segítségével határoztuk meg.

3.2.5. Statisztikai analízis

A kísérleti adatokat egy, illetve szükség szerint többtényezős variancia analízissel és t-próbával hasonlítottuk össze, $P=0,01$ vagy $P=0,05$ megbízhatósági szinten.

3.2.6. Rövidítések

ISH: *in situ* hibridizáció

FISH: fluoreszcens *in situ* hibridizáció

GISH: genomikus *in situ* hibridizáció

PCR: polimeráz lánc reakció (polymerase chain reaction)

DNS: dezoxiribonukleinsav

RNS: ribonukleinsav

RNáz: ribonukleáz enzim

DNáz: dezoxiribonukleáz enzim

dNTP: nukleotid keverék (dCTP, dGTP, dATP, dTTP)

SSC: trinátrium-citrát és nátrium-klorid oldatok megfelelő arányú keveréke
(Saline sodium citrate)

NT puffer: Nick transzlációs puffer

PK puffer: proteináz-K puffer

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

TRIS: trisz (hidroxi-metil) amino-metán

TE: trisz-EDTA

Tween: polioxietilén-szorbitán-monolaurát

PI: propidium jodid

DAPI: 4,6 diamidino-2-fenilindol

Alkalmazott pufferek összetétele:

NT puffer (nick transzlációs puffer): 0,5M TRIS,
0,05M magnézium-klorid,
0,5mg/ml bovin-szérum-albumin,
(pH 7,8)

PK puffer: 0,2M TRIS,
0,02 M kalcium-klorid
(pH 7,5)

PK Stop puffer: 0,2M TRIS,
0,2M EDTA(pH 7,5)

DNS extrakciós puffer: 100mM TRIS,
100mM EDTA,
250mM nátrium-klorid,
0,5%SDS
100µg/ml proteináz K
(pH 8,5)

4. EREDMÉNYEK

4. 1. Búza × árpa hibridizáció

4.1.1. Új őszi búza × őszi árpa hibridek előállítása

Keresztezések

A Chinese Spring × Betzes tavaszi búza × tavaszi árpa hibrid előállítása után (Lángné Molnár M. 1992, Kandidátusi értekezés) a következő őszi árpafajtákkal sikerült új hibrideket létrehozni: Igri (német, kétsoros), Manasz, Osznova (ukrán, hatsoros) (1. táblázat). Az új őszi búza × őszi árpa hibrid létrehozására irányuló kísérleteinkben 14 különböző őszi árpafajtával végeztünk keresztezéseket, de ezek közül csak három genotípussal sikerült szemkötést elérnünk (0,4%; 0,3%; 0,1%), annak ellenére, hogy kísérleteinkben több éven keresztül több ezer virágot (összesen 10 407 virág) poroztunk meg. Az Mv9 kr1 × Igri, az Mv9 kr1 × Osznova és az Asakaze komugi × Manasz kombinációkban állítottunk elő hibrideket. A keresztezéseket a korábban Martonvásáron a Chinese Spring × Betzes modell hibridre kidolgozott optimális körülmények közt végeztük fitotronban, a virágokat hormonokkal kezeltük, a fejlődő embriókat megporzás után három héttel steril körülmények közt kiperparáltuk és *in vitro* neveltük fel.

A következő árpafajtákkal nem sikerült szemkötést elérnünk a búzán: Mv 37, Mv 38, Kompolti korai, Attila, Botond, Swift, Duet, NRPB, P-284-90, Intro, Trasco, Mv 50, Kaliforniai Mariout (1. táblázat). Az Mv 50 árpafajtával korábban sikeresen állítottunk elő árpa × búza hibridet (Lángné és mtsai, 1985), amikor az Mv 50 tavaszi árpafajtát anyai partnerként használtuk. A reciprok kombináció létrehozása ezzel az árpafajtával már nem sikerült, annak ellenére, hogy az Mv9 kr1 búzatörzs 1750 virágát poroztuk meg az Mv 50 árpafajtával.

A sikeres keresztezésekben a maximális szemkötés 0,4% volt (Mv9 kr1 × Osznova). Megállapítható, hogy a búza és az árpa közt fennálló inkompatibilitás miatt a búza × árpa keresztezésekben a várható szemkötési érték nagyon kicsi és sok kombinációban nem fejlődnek hibrid embriók.

1. táblázat

Búza × árpa hibridek előállítása (1994-1997, Martonvásár, Fitotron)

A különböző kombinációkban megporzott virágok, kipreparált embriók, illetve felnevelt növények száma

Anyai partner, búza genotípus	Megporzó árpa fajta	Megporzott virágok száma	Kipreparált embriók száma	Hibrid növények száma
Mv9 kr1	Igri	3012	3	1
Mv9 kr1	Osznova	254	1	1
Asakaze komugi	Manasz	676	2	1
Asakaze komugi	Osznova	508	0	0
Mv9 kr1	Manasz	1865	0	0
Mv9 kr1	Mv 37	148	0	0
Mv9 kr1	Mv 38	192	0	0
Mv9 kr1	Kompolti korai	442	0	0
Mv9 kr1	Attila	180	0	0
Mv9 kr1	Botond	346	0	0
Mv9 kr1	Swift	136	0	0
Mv9 kr1	Duet	92	0	0
Mv9 kr1	NRPB	34	0	0
Mv9 kr1	P-284-90	210	0	0
Mv9 kr1	Intro	188	0	0
Mv9 kr1	Trasco	162	0	0
Mv9 kr1	Mv 50 (tavaszi)	1750	0	0
Mv9 kr1	Kaliforniai Mariout	212	0	0
Összesen		10407	6	3

A hibridek morfológiai leírása

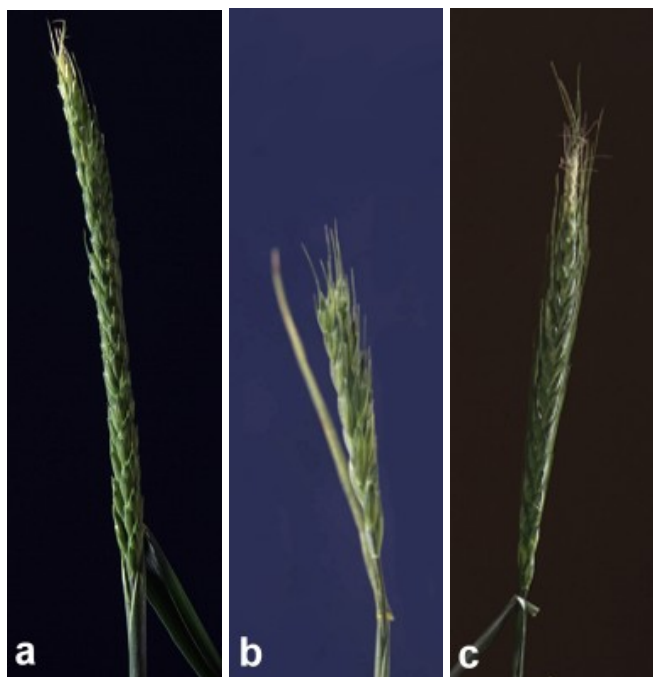
Az Mv9 kr1 \times Igri és az Asakaze komugi \times Manasz hibridek életerősek voltak (1. ábra) és jól bokrosodtak, ami lehetővé tette, hogy a főkalászt izoláljuk, a mellékkalászok közül egyről portokokat gyűjtsünk meiózis vizsgálatra, más kalászokat megporozzunk búzával és fejlődő kalászkezdeményeket tegyünk le *in vitro* szaporításra.



1. ábra Az Asakaze komugi \times Manasz hibrid

Az Mv9 kr1 \times Osznova hibrid az előző kettő hibridnél kevésbé bokrosodott, csak két kalásza volt. Ennek a kombinációnak a kalásza volt a legrövidebb, mindössze 14 kalászka volt a főkalászon. A búza \times árpa hibridek kalászaiban elsősorban a búzához hasonlítottak, de laza szerkezetűek voltak. Az Asakaze komugi \times Manasz hibridek kalászaiban (2.c ábra) rendelkeztek a leghosszabb szálkával, ebben a kombinációban ugyanis a búza partner is szálkás volt. Az

Mv9 kr1 \times Igri hibrid kalászaiban szálcacsökevények (2.a ábra), az Mv9 kr1 \times Osznova hibrid kalászaiban pedig rövid szálcák voltak megfigyelhetők (2.b ábra). Az Mv9 kr1 \times Igri hibrid kalásza hosszú volt, a főkaláson 34 kalászska helyezkedett el. A hibridek a búzánál világosabb zöld színűek voltak. Mindhárom hibrid teljes hím és nősterilitást mutatott, nemcsak az izolált kalászban, de a búzával végzett megporzás után sem kaptunk rajtuk szemeket.



2. ábra Búza \times árpa hibridek kalásza. a, Mv9 kr1 \times Igri, b, Mv9 kr1 \times Osznova, c, Asakaze komugi \times Manasz.

4.1.2. A hibridek elszaporítása szövettenyésztésben

A hibridek teljes sterilitása miatt azokat szövettenyésztésben szaporítottuk el. A kalluszindukcióra fejlődő kalászkezdeményeket használtunk. Az Mv9 kr1 \times Igri hibridből 101 regeneráns növénykét ültettünk földbe, amelyek közül 92-öt neveltünk fel. Az Asakaze komugi \times Manasz hibridből 148 regeneráns növénykéből 124-et tudtunk felnevelni. A regeneráns hibrid növények meiózisének I. metafázisában Feulgen módszerrel és GISH-sel vizsgáltuk a növények kromoszóma-konstitúcióját és a kromoszómák párosodását. A regenerált hibrideket búzával megporoztuk és a visszakeresztelésből BC₁ szemeket kaptunk.

Az Mv9 kr1 × Igri hibridből regenerált utódokon Mv9 kr1 búzatörzsszel végzett megporzás után 6 darab BC₁ szemet kaptunk (2. táblázat). A 6 darab BC₁ növény búzával végzett ismételt megporzása után 24 darab BC₂ szem fejlődött. A BC₂ szemek kromoszómaszámát 43-46-nak határoztuk meg. A BC₂ szemek öntermékenyített utódai közül válogattunk ki később Mv9kr1/Igri diszómás addíciós vonalakat.

Az Asakaze komugi × Manasz hibridből regenerált utódokon Asakaze komugi búzafajtával végzett megporzáskor annak ellenére nem kaptunk egyetlen egy BC₁ szemet sem, hogy igen nagyszámú virágot (összesen 3150-et) poroztunk meg búzával. Az Mv9 kr1 búzatörzsszel végzett megporzásból azonban 3 embriót tudtunk kipreparálni (2. táblázat). A 3 embrió közül egyből akkora növényke fejlődött, amelyet már talajba ültethettünk, azonban az kiültetés után három héttel elpusztult. A hibrid fenntartása érdekében a regeneránsok fejlődő kalászkezdeményeit szövettenyészetben ismételten elszaporítottuk és a második ciklusban 134 regeneráns növénykét ültettünk ki ebből a kombinációból.

2. táblázat

Búza × árpa hibridek szövettenyészetben elszaporított utódainak megporzása búzával

Hibrid	Megporzó búzafajta	Megporzott virágok száma	Embriók száma	Növények száma
Mv9 kr1 × Igri ^R	Mv9 kr1	4606	9	6
Mv9 kr1 × Igri ^R	CO4-1	340	2	1
Asakaze komugi × Manasz ^R	Mv9 kr1	1280	3	1
Asakaze komugi × Manasz ^R	A.komugi	3150	-	-
(Mv9 kr1 × Igri ^R) × Mv9 kr1	Mv9 kr1	656	-	24
(Mv9 kr1 × Igri ^R) × CO4-1	Mv9 kr1	354	-	1

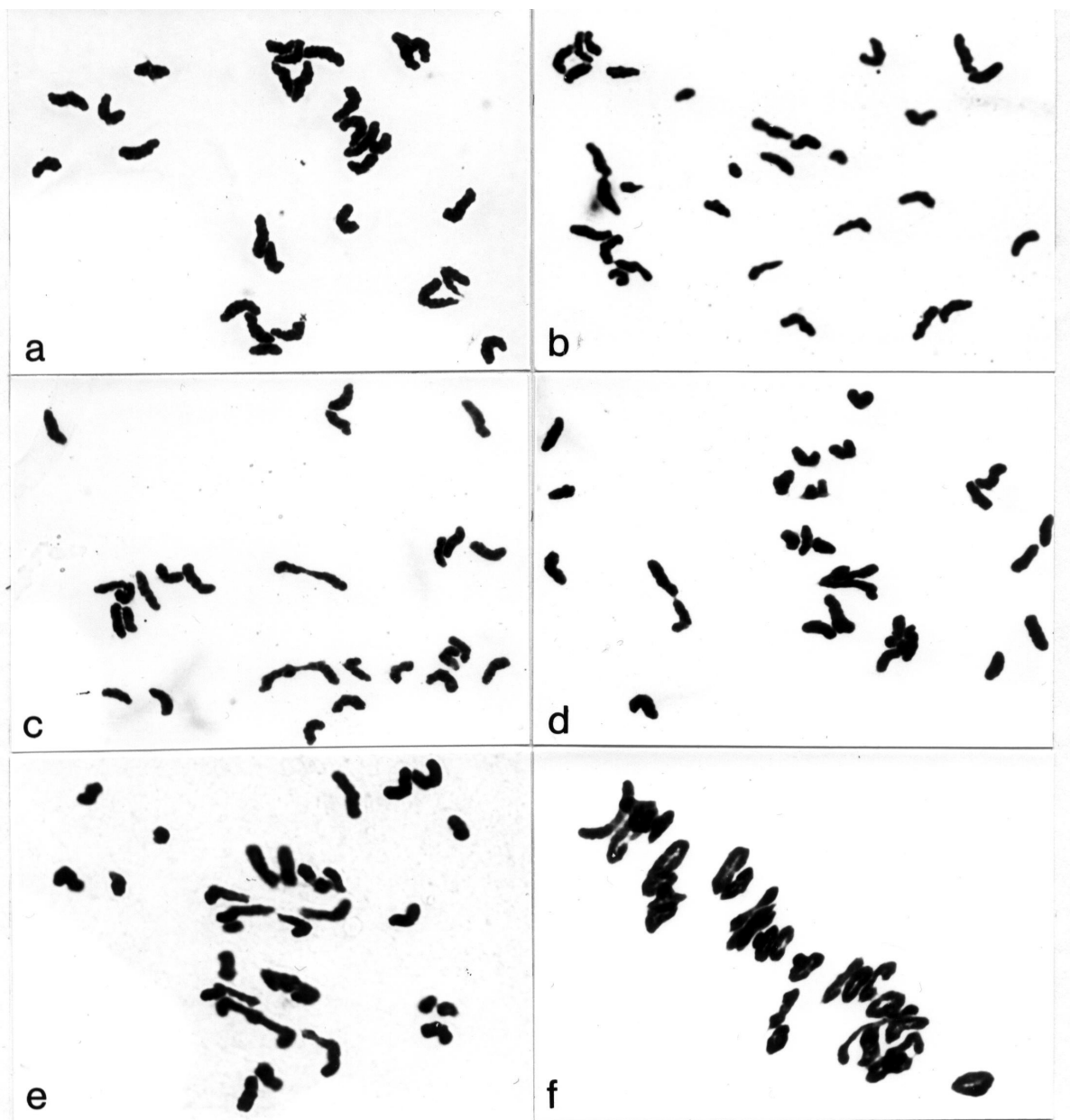
^RA kiindulási hibrid fejlődő kalászkezdeményeiből regenerált növények

4.1.3. A kromoszóma-párosodások vizsgálata a hibridekben

Kromoszóma-konfigurációk vizsgálata Feulgen módszerrel

Az Mv9 kr1 \times Igri és Asakaze komugi \times Manasz hibridek és szövettényészetben elszaporított utódaik kromoszóma-párosodását Feulgen módszerrel és GISH-sel vizsgáltuk a meiózis I. metafázisában (3., 4. táblázat). A hibridek várható kromoszómaszáma 28 volt (21 búza + 7 árpa), amelyet a citológiai vizsgálatok is megerősítettek (3. ábra). A két kiindulási hibridben az univalensek száma nagyon hasonló volt (25,15 és 25,21). Trivalenseket és quadrivalenseket csak az Mv9 \times Igri kombinációban figyeltünk meg. Az univalensek centroméránál történő rendellenes szétválásának, miszdivíziójának következtében létrejövő telocentrikus kromoszómák nagyobb számban fordultak elő az Mv9 \times Igri kombinációban mint az Asakaze komugi \times Manasz hibridben. A sejtenkénti kromoszómakar asszociációk száma mindkét hibridkombinációban 1,59 volt (3. táblázat). A két kombinációban néhány sejtben akár 9 illetve 10 bivalens is előfordult, így a sejtenkénti kromoszómakar asszociációk maximális száma az egyes hibridekben 18 illetve 19 volt. Néhány sejtben endoreduplikációt figyeltünk meg, azaz a kromoszómák száma 56 volt.

A szövettényészetben regenerált utódokban a sejtenkénti univalensek száma kisebb volt, mint a kiindulási hibridben. A regeneránsokban nőtt a bivalensek száma és a telocentrikus kromoszómák száma a kiindulási hibridhez képest. Ennek eredményeként a sejtenkénti kromoszómakar asszociációk száma jelentősen megnőtt a regeneránsokban a kiindulási hibridhez képest mindkét kombinációban (3. táblázat). A regeneránsokban nagyobb számban figyeltünk meg 56 kromoszómaszámú sejteket, mint a kiindulási hibridekben.



3. ábra A búza \times árpa hibridek meiózisének I. metafázisában a kromoszómák párosodása.

A kromoszómák festése Feulgen módszerrel történt.

a, Huszonnyolc univalens kromoszóma az Mv9 kr1 \times Igri hibridben. b, Huszonnégy univalens, egy nyílt bivalens, és négy telocentrikus kromoszóma az Asakaze komugi \times Manasz hibridben. c, Huszonnégy univalens és két nyílt bivalens az *in vitro* regenerált Mv9 kr1 \times Igri hibridben. d-f, Az *in vitro* regenerált Asakaze komugi \times Manasz hibrid pollenanyasejtjei. d, Huszonöt univalens (kettő közülük miszdivizóval kettévált) és egy trivalens. e, Tizenöt univalens (egy közülük miszdivizióval kettévált), négy telocentrikus kromoszóma, négy nyílt bivalens, egy gyűrű (zárt) bivalens. f, Huszonhat gyűrű bivalens és két nyílt bivalens.

3. táblázat

Búza × árpa hibridek kromoszóma párosodásának sejtenkénti átlag értékei a meiózis I. metafázisában,
Feulgen módszerrel végzett vizsgálatban
(a szélső értékek az átlagok alatt zárójelben találhatóak)

Hibrid kombináció	Vizsgált sejtek száma	Kromo- szóma- szám	Uni- valens	Bivalens		Tri- valens	Quadri- valens	Telo- centrikus kr.	Frag- mens	Izo- kromoszóma	Sejtenkénti kromoszómakar asszociációk száma
				Nyílt	Zárt						
Mv9 kr1 × Igri	120	28	25.15 (12-28)	0.52 (0-4)	0.48 (0-8)	0.025 (0-1)	0.008 (0-1)	1.51 (0-10)	-	-	1.59 (0-18)
Asakaze komugi × Manasz	75	28	25.21 (8-28)	0.69 (0-4)	0.45 (0-9)	-	-	0.85 (0-6)	0.05 (0-2)	0.05 (0-1)	1.59 (0-19)
Mv9 kr1 × Igri (R*)	51	28	21.43 (6-28)	1.12 (0-5)	1.8 (0-10)	-	-	2.00 (0-10)	0.16 (0-4)	0.04 (0-1)	4.72 (0-22)
Asakaze komugi × Manasz (R*)	214	28	23.77 (10-28)	0.87 (0-5)	0.87 (0-8)	0.02 (0-1)	-	1.16 (0-8)	0.02 (0-2)	0.04 (0-1)	2.67 (0-17)

R*:a kiindulási hibridből szövettényészetben regenerált utódok

Kromoszóma-konfigurációk vizsgálata genomikus in situ hibridizációval (GISH)

Az Mv9 kr1 × Igri kombinációból a kiindulási hibrid és a szövettenyészetben regenerált utódok kromoszóma párosodását vizsgáltuk GISH-sel. A másik kombinációban a kiindulási hibriden nem sikerült GISH-t végezni, csak a regenerált utódok kromoszóma párosodását tudtuk vizsgálni ezzel a módszerrel (4. táblázat). A hibridekben a búza és az árpa kromoszómák jól megkülönböztethetők voltak. Az árpa DNS fluorogreennel végzett jelölésének következtében az árpa kromoszómák sárgászöldek lettek, a DAPI kontrasztfestés eredményeként a búza kromoszómák kékek (4. ábra). A sejtenkénti összes kromoszómakar asszociációk száma az Mv9 kr1 × Igri hibridben 0,83 volt, azaz majdnem minden sejtben megfigyelhető volt egy-egy asszociáció. Az összes kromoszómakar asszociációk 77,7 - 89,0%-át a búza kromoszómák közt létrejött asszociációk tették ki (5. táblázat). Gyűrű bivalenseket csak a búza kromoszómák közt figyeltünk meg. Az árpa kromoszómák közt fellépő kromoszómakar asszociációk száma 4,4 és 10,8% közt volt a különböző kombinációkban. A búza és az árpa kromoszómák közt létrejövő kromoszómakar asszociációkat az Mv9 kr1 × Igri kombinációban két sejtben figyeltünk meg, ami az összes asszociáció 3,6%-át jelenti. A szövettenyészetben regenerált Mv9 kr1 × Igri utódokban hat sejtben tapasztaltunk kromoszóma-párosodást a búza és az árpa kromoszómák közt, ami ezekben a sejtekben az összes kromoszómakar asszociáció 16,5%-át jelenti.

Az Asakaze komugi × Manasz hibridből regenerált utódokban hét sejtben láttunk búza-árpa nyílt bivalenseket. A két faj kromoszómái közt két trivalens konfiguráció létrejöttét is megfigyeltük, az egyik esetben egy árpa és két búza kromoszóma, a másik esetben egy búza és két árpa kromoszóma közt. A telocentrikus kromoszómák száma jelentősen megnőtt az *in vitro* szaporítás után. A kromoszómakar asszociációk számát a GISH analízis során kevesebbnek találtuk, mint a Feulgen analízis folyamán. A különbség esetleg annak tudható be, hogy a GISH analízis során a jelöletlen búza kromoszómák közti asszociációk kevésbé jól láthatók, mint Feulgen festéssel.

4. táblázat

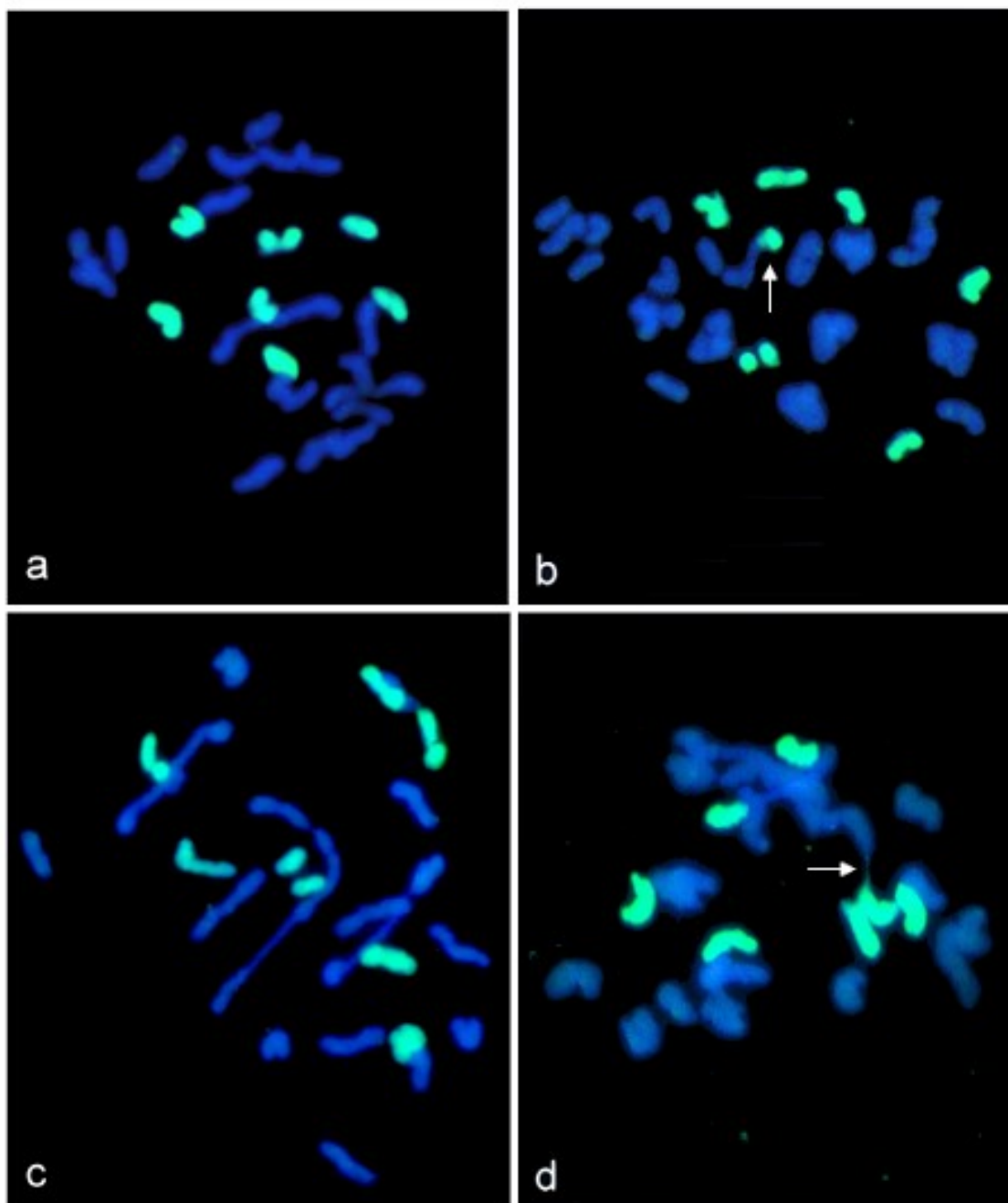
Búza × árpa hibridek kromoszóma-párosodásának sejtenkénti átlag értékei a meiózis I. metafázisában,
genomikus *in situ* hibridizációval (GISH) végzett vizsgálatban
(a szélső értékek az átlagok alatt zárójelben találhatóak)

Hibrid- kombiná- ció	Vizsgált sejtek száma	Kromo- szóma- szám	Árpa			Búza			Búza-árpa nyílt bivalens	Búza- árpa trivalens	Sejtenkénti kromoszó- makar asszociáció		
			Uni- valens	Bivalens		Telo- centrikus kr.	Uni- valens	Bivalens				Tri- valens	
				Nyílt	Zárt			Nyílt					Zárt
Mv × I	67	28	6.72 (5-7)	0.09 (0-1)	- -	0.24 (0-2)	19.62 (15-21)	0.61 (0-2)	0.04 (0-1)	0.01 (0-1)	0.03 (0-1)	- -	0.83 (0-4)
Mv × I	44	28	4.95	0.05	-	1.90	19.95	0.32	0.14	0.02	0.14	-	0.85
(R*)			(0-7)	(0-1)	-	(0-14)	(6-21)	(0-2)	(0-6)	(0-1)	(0-1)	-	(0-13)
A × M	81	28	6.30	0.07	-	0.89	18.49	0.80	0.36	0.04	0.09	0.03 ^{xx}	1.82
(R*)			(4-7)	(0-2)	-	(0-8)	(7-21)	(0-5)	(0-5)	(0-1)	(0-2)	(0-1)	(0-12)

Mv × I: Mv9 kr1 × Igri; A × M: Asakaze komugi × Manasz

R*: a kiindulási hibridből szövettenyészetben regenerált utódok

^{xx}: 1 trivalens: búza-búza-árpa, 1 trivalens: búza-árpa-árpa



4. ábra Genomikus *in situ* hibridizáció búza \times árpa hibridek és *in vitro* regenerált utódaik meióziséban I. metafázisában. Fluorogreennel jelölt teljes genomi árpa DNS-t használtunk próbaként, így az árpa kromoszómák sárgászöldek, a búza kromoszómák a DAPI kontrasztfestés következtében kékek. a, Hét árpa univalens (egy miszdivízióval kettévált), 19 búza univalens és 1 búza nyílt bivalens az Mv9 kr1 \times Igr1 hibridben. b, Egy hiperploid sejt az *in vitro* regenerált Mv9 kr1 \times Igr1 hibridben, amelyben 1 búza-árpa nyílt bivalens (nyíllal jelölve), 6 árpa univalens, 6 búza gyűrű bivalens, 2 búza nyílt bivalens, 6 búza univalens és 2 búza kromoszóma fragmentum látható. c, Hét árpa univalens (egy miszdivízióval kettévált), 1 búza trivalens, 3 búza nyílt bivalens és 10 búza univalens az *in vitro* regenerált Asakaze komugi \times Manasz hibridben. d, Egy búza-árpa nyílt bivalens (nyíllal jelölve), 6 árpa univalens az *in vitro* regenerált Asakaze komugi \times Manasz hibridben.

5. táblázat

A sejtenkénti átlagos kromoszómakar asszociációk száma a búza × árpa hibridek pollen anyasejtjeiben

Hibrid	Búza-búza	Búza-árpa	Árpa-árpa	Összes
Mv9 kr1 × Igri	0.71 (85.5%)	0.03 (3.6%)	0.09 (10.8%)	0.83 (100%)
Mv9 kr1 × Igri (R*)	0.66 (77.7%)	0.14 (16.5%)	0.05 (5.8%)	0.85 (100%)
Asakaze komugi × Manasz (R*)	1.62 (89%)	0.12 (6.6%)	0.08 (4.4%)	1.82 (100%)

R*: a kiindulási hibrid fejlődő kalászkezdeményeiből szövettényészetben regenerált utódok

4.1.4. Új búza/árpa addíciós vonalak előállítása

4.1.4.1. Mv9 kr1/Igri addíciós vonalak létrehozása

Az Mv9 kr1 × Igri hibridből regenerált utódokon Mv9 kr1 búzatörzzsel végzett megporzás után 6 darab BC₁ szemet kaptunk (2. táblázat), amelyek ismételt megporzása után 24 darab BC₂ szem fejlődött. A BC₂ szemek kromoszómaszámát 43-46-nak határoztuk meg. A BC₂F₁ növények öntermékenyített utódai közül válogattuk ki az Mv9 kr1/Igri diszómás addíciós vonalakat. A 24 BC₂F₁ növény közül 14 volt fertilis (6. táblázat). A 14 BC₂F₁ növényen önmegporzáskor összesen 735 szemet kaptunk. Ezeket a szemeket csíráztattuk és Feulgen módszerrel meghatároztuk a kromoszómák számát. A szemek többségében eliminálódott az árpa kromoszóma, az utódok szemszáma 42 lett. Sikerült kiválogatnunk azonban 43 és 44 kromoszómaszámú utódokat, melyek kromoszóma konstitúcióját meiózisban is ellenőriztük. A 43 kromoszómaszámú növények meiózisában általában 21 bivalenst és egy idegen kromoszómát figyeltünk meg, a 44 kromoszómaszámú növényekben 21 bivalens mellett sokszor két univalens volt megfigyelhető, egyes esetekben 22 bivalenst számoltunk. A 43 kromoszómaszámú növények öntermékenyített utódai közül kiválogattunk 44 kromoszómaszámú, meiózisban 22 bivalenst mutató utódokat. Három vonalat találtunk, melyek több nemzedéken keresztül stabilan 44 kromoszómaszámúak voltak, és meiózisban 22 kromoszómapárt tartalmaztak. A három diszómás addíciós vonal kiválogatásához összesen 679 szem kromoszómaszámának meghatározása volt szükséges, amelyet 4 generáción keresztül végeztünk. Az addíciós vonalak azonosítását molekuláris citogenetikai

módszerekkel hajtottuk végre, amelyhez először laboratóriumunkban ki kellett dolgoznunk az árpa és a búza kromoszómák FISH mintázatát.

6. táblázat

Az Mv9 kr1 × Igrí hibrid búzával kétszeresen visszakeresztezett BC₂F₁ utódainak kromoszómaszáma és kalászonkénti szemszáma önmegporzáskor

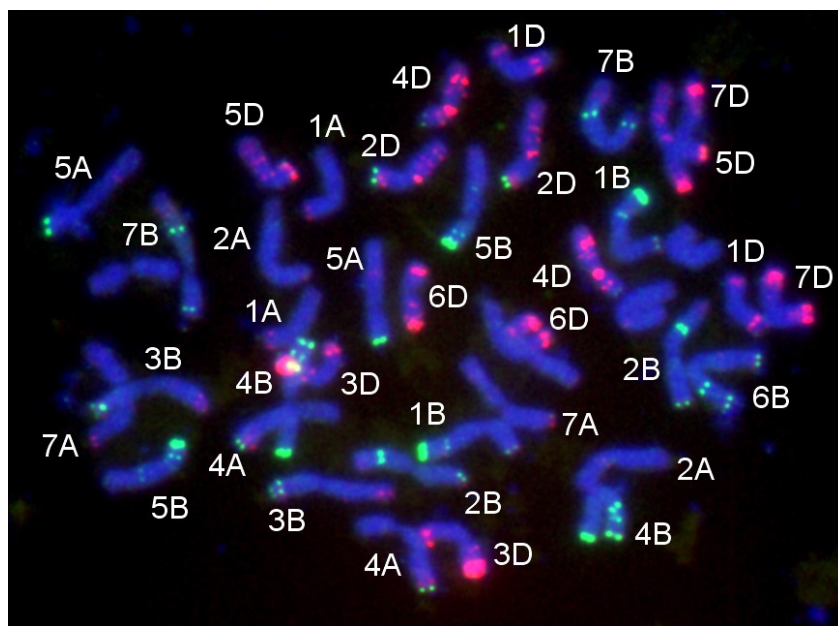
A növény sorszáma	Kromoszómaszám	Szemszám
1*	50 + 1 telo	-
2	43	0
3	NC***	44
4	43	16
5	44	45
6	43	38
7	44	91
8	45	20
9	44 + 1 telo	77
10	Nem csírázott	0
11	Nem csírázott	0
12	44	0
13	44	93
14	NC	4
15	43	80
16	Nem csírázott	0
17	Nem csírázott	0
18	43	5
19	43	10
20	46	165
21	46	47
22	Nem csírázott	
23	Nem csírázott	
24	Nem csírázott	
25	Nem csírázott	

*Az 1. sorszámú növény előállításakor az első visszakeresztézést a CO4-1 genotípussal, a második visszakeresztézést az Mv9 kr1 búzatörzsszel végeztük.

** A 2-25. sorszámú növények előállításakor az Mv9 kr1 × Igrí hibridet egymás után kétszer az Mv9 kr1 búzatörzsszel kereszteztük vissza.***NC: nem számolható

Búza és árpa kromoszómák azonosítása fluoreszcens in situ hibridizációval, repetitív DNS próbák segítségével

Az addíciós vonalak azonosításának érdekében szükségessé vált, hogy minden búza és árpa kromoszómát pontosan felismerjünk, amelynek érdekében molekuláris citogenetikai módszereket használtunk. A búza kromoszómák közül 17, esetenként 19 pár a korábban leírt módszerek alapján a pAs1 és a pSc119.2 DNS klónok használatával FISH-sel azonosítható. Az Mv9 kr1 búzatörzs 1B és a 6B kromoszómájának szatellitjén eltéréseket figyeltünk meg a Chinese Spring búzafajta kromoszómáihoz képest (Schneider és mtsai, 2003) (5. ábra). A GAA trinukleotid és a pAs1 próbák kombinálásával Pedersen és Langridge (1997) leírása alapján minden búza kromoszómát azonosítani tudtunk. Az árpa kromoszómák FISH analízisét a GAA trinukleotid, a HvT01 szubtelomérás ismétlődő szekvencia és a pTa71 riboszómális DNS próbákkal végeztük (Molnár-Láng és Szakács, 2006), mert a pAs1 és a pSc119.2 próbákkal nem különböztethetők meg egymástól.



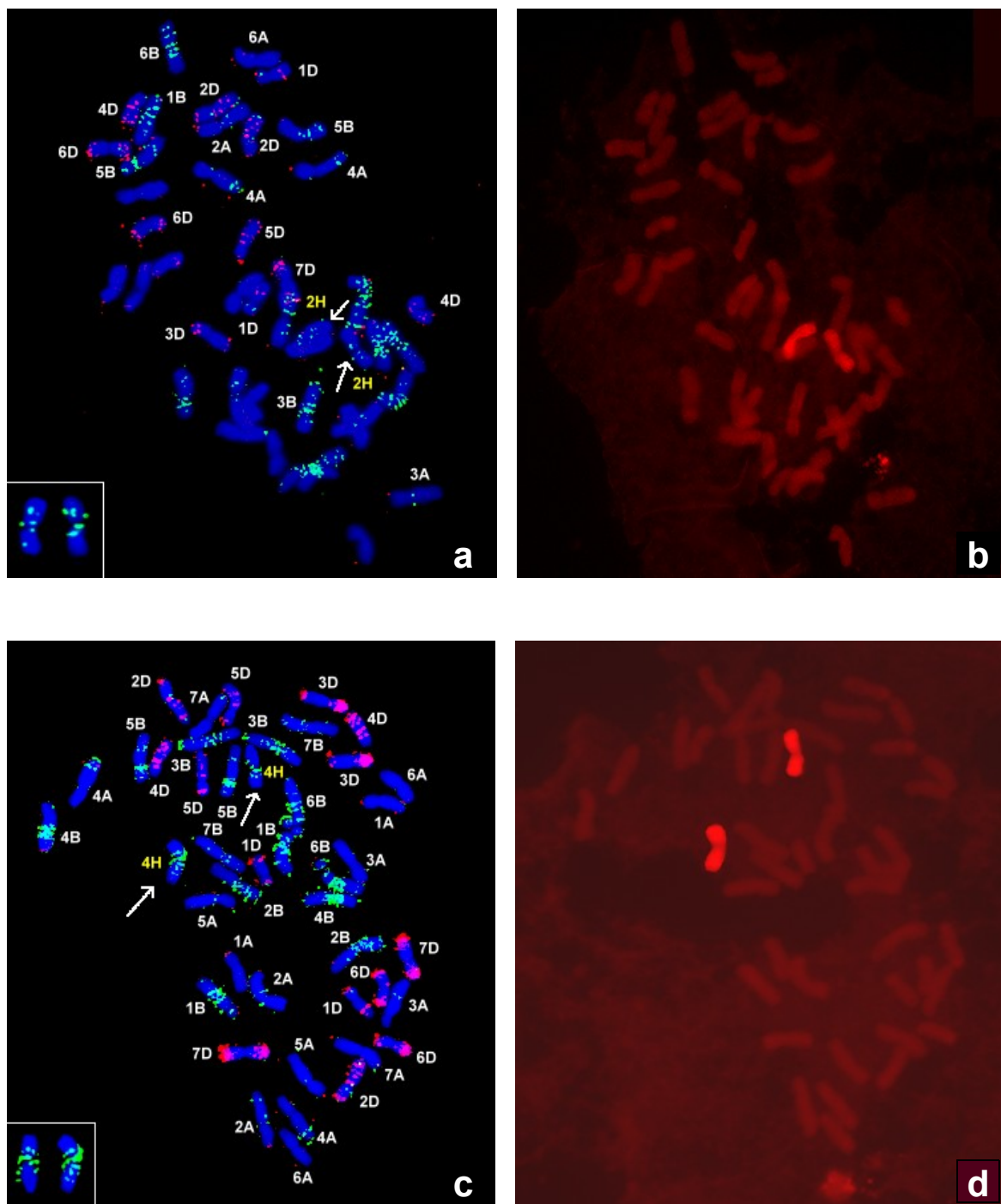
5. ábra Az Mv9 kr1 búzatörzs kromoszómáinak azonosítása fluoreszcens *in situ* hibridizációval, két repetitív DNS próba segítségével. A pSc119.2 próbát Fluorogreennel (sárgászöld), a pAs1 próbát Fluororeddel (piros) jelöltük, a kontrasztfestés (DAPI) eredményeként a búza kromoszómák kéken jelölődtek.

Mv9 kr1/Igri addíciós vonalak (2H, 3H, 4H, 1HS izokromoszóma) azonosítása FISH-sel

A 2H Mv9 kr1/Igri addíciós vonalat a GAA trinukleotid és a pAs1 próbák alkalmazásával azonosítottuk FISH-sel (6.a ábra). A 2H kromoszóma GAA mintázata nagyon hasonlít a korábban C-sávozással kapott festődéshez, mindkét karon szimmetrikus intersticiális sávok láthatók (Jensen és Linde-Laursen, 1992; Linc és Lángné Molnár, 2003). A 2H jelenlétét a FISH után végzett GISH-sel is megerősítettük, miután a FISH-sel 2H-nak azonosított kromoszómán intenzív jelölődést tapasztaltunk a fluororeddel jelölt teljes árpa genomi DNS-sel (6.b ábra). A HvT01 próba alkalmazásakor a 2H árpa kromoszómán csak a rövid kar végén figyeltünk meg hibridizációs jelet, a hosszú karon nem. Az árpa kromoszómák közül csak a 2H és az 5H kromoszómákra jellemző, hogy csak az egyik kar disztális régiójában figyelhető meg FISH hibridizációs szignál. Az 5H kromoszóma azonban szatellittel rendelkezik, így a DAPI kontrasztfestésnél az 5H a 2H-től jól elkülöníthető. A 2H jelenlétét a HvM36 mikroszatellit markerrel is megerősítettük, amelyet korábban a 2H kromoszómára térképeztek (7. ábra).

Ez az addíciós vonal hosszú, laza kalással rendelkezik (8. ábra), a növény lényegesen magasabb, mint a búza szülőpartner (7. táblázat). Fertilitása elmarad az Mv9 kr1 búzatörzsétől. Ezt a vonalat 2005-ben tenyészkertben felszaporítottuk, így megfelelő mennyiségű szemmel rendelkezünk a további vizsgálatokhoz.

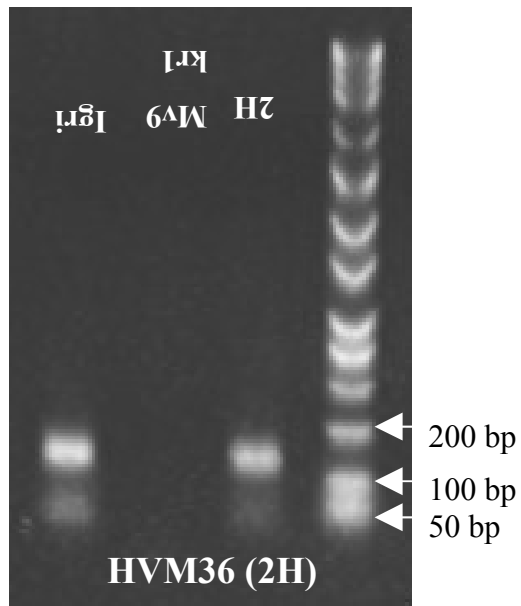
A 3H Mv9 kr1/Igri addíciós vonalat első lépésben a GAA trinukleotid és a pAs1 próba kombinációjával azonosítottuk FISH-sel. Az egy pár árpa kromoszóma jelenlétét ugyanazon a preparátumon GISH-sel is megerősítettük. A GAA próba nem volt elegendő ennek a vonalnak az egyértelmű azonosításához, mert a centroméra közelében megfigyelhető hibridizációs jelek nagyon hasonlóak a 7H árpa kromoszómán láthatókhöz. Ennek a vonalnak a meghatározásához ezért felhasználtuk a HvT01 szubtelomérás ismétlődő szekvenciát is (9. ábra). Ezzel a próbával a 3H árpa kromoszóma jól felismerhető, mert egyedül a 3H hosszú karjának terminális részén figyelhető meg három sáv az Igri árpafajtában (Molnár-Láng és Szakács, 2006). Korábban Schubert és munkatársai (1998) is leírták, hogy a HvT01 szubtelomérás ismétlődő szekvenciával végzett FISH után a 3H kromoszóma hosszú karjának a végén egy telomérás, egy szubtelomérás és egy gyenge intersticiális hibridizációs jel látható.



6. ábra A 2H és a 4H Mv9 kr1/Igri addíciós vonalak szomatikus kromoszómái mitózisban egymást követő FISH és GISH után. a,c, A kromoszómák azonosítását FISH-sel a GAA trinukleotid (sárgászöld) és a pAs1 (piros) DNS próbák alkalmazásával végeztük. b,d, Az árpa kromoszómák kimutatása GISH-sel. A teljes genomi árpa DNS-t fluororeddel jelöltük. Az árpa kromoszómák pirosan jelölődtek. a,b, 2H addíciós vonal. c,d, 4H addíciós vonal.

A citogenetikai azonosítást molekuláris markerekkel is megerősítettük. A HvM60 és a HvM62 mikroszatellit markerekkel végzett analízis után a várt PCR termékeket kaptuk. A 3H addíciós vonal rövid, tömött kalásszal rendelkezik (8. ábra). A kalászokon rövid szálkacsőkevények láthatók. A növények alacsonyak és fertilitásuk elmarad az Mv9 kr1 búzatörzsétől (7. táblázat). Ezt az addíciós vonalat 2005-ben tenyészkertben felszaporítottuk.

A 4H Mv9 kr1/Igri addíciós vonalat a GAA trinukleotid és a pAs1 próbák alkalmazásával azonosítottuk FISH-sel (6.c ábra). A 4H kromoszóma a GAA hibridizációs mintázat alapján a legkönnyebben felismerhető árpa kromoszóma, mert ez adja a legtöbb jelet. Giemsa festéskor, C-sávozással is a 4H a legheterokromatikusabb kromoszóma (Linc és Lángné Molnár, 2003). A FISH után ugyanazon a preparátumon elvégezve a GISH-t is a 4H kromoszómák a búza genomban kimutathatók voltak (6.d ábra). A HvT01 szubtelomérás ismétlődő szekvenciával is elvégeztük a FISH-t. Ennek a próbának a jellegzetessége, hogy csak az árpa kromoszómákhoz hibridizál, a búzához nem. Az addíciós vonalban a két árpa kromoszóma mindkét végén kaptunk jelet, a 4H kromoszómán várhatóan megfelelően. A 4H árpa kromoszómán térképezett HvM40 és HvM67 mikroszatellit markerek is megerősítették a citogenetikai azonosítást. A 4H addíciós vonal tömött kalásszal rendelkezik, a kalász csúcsi részén rövid szálkacsőkevények figyelhetők meg (8. ábra). A kalász felső harmadában a kalászkák tömöttebben helyezkednek el, mint az alsó kétharmadban. A kalászok fertilitása nem marad el a búza szülőpartnerétől (7. táblázat), de a növények azoknál szignifikánsan alacsonyabbak. Ezt a vonalat tenyészkertben felszaporítottuk, így a további vizsgálatokhoz megfelelő számú szemmel rendelkezünk.



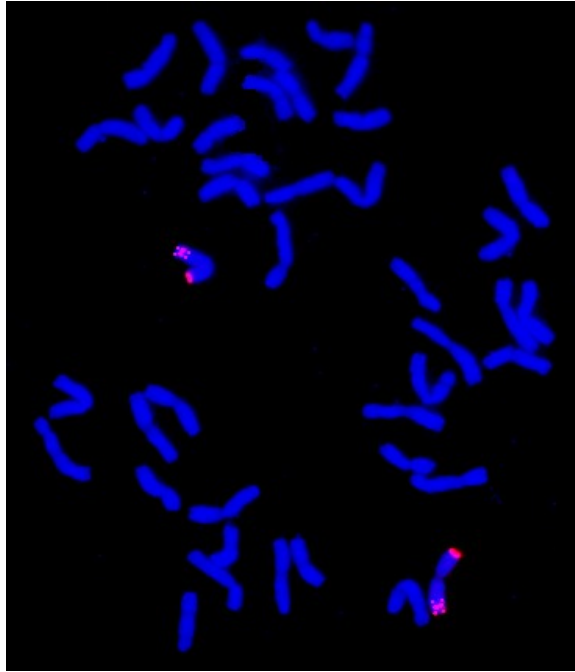
7. ábra A 2H addíciós vonal azonosítása a HVM36 mikroszatellit marker segítségével



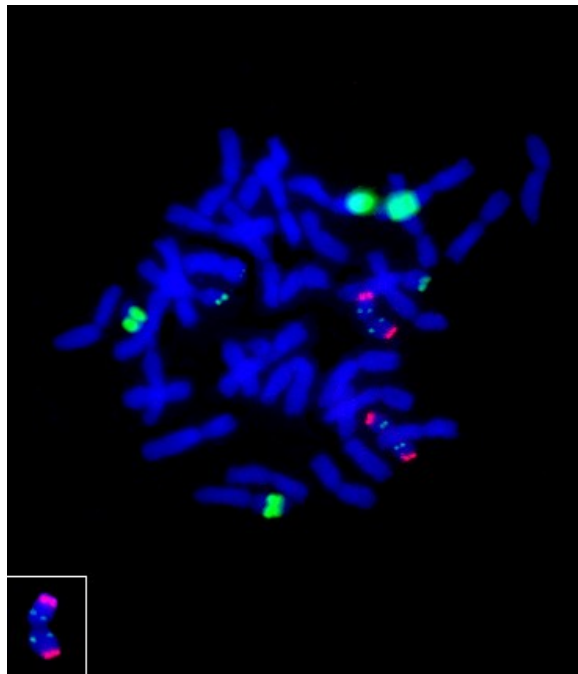
8. ábra Az Mv9kr1/Igri addíciós vonalak és a szülőpartnerek kalásza.

Balról jobbra: Mv9 kr1, Igri, 2H, 3H, 4H, 1HS izokromoszómát tartalmazó diszómás addíciós vonalak.

A negyedik addíciós vonal azonosítása volt a legnehezebb, de végül megállapítottuk, hogy ez a vonal az 1HS izokromoszómát tartalmazza diszómás állapotban. A GAA trinukleotid szekvencia a centroméra közeli régióhoz hibridizált. A HvT01 próba a kromoszóma mindkét karjának a végén adott hibridizációs jelet, így a két próba mintázata alapján feltételeztük, hogy ez a vonal a 7H árpa kromoszómapárt tartalmazhatja. Az 5H és a 6H árpa kromoszómák jelenléte kizárható volt, mert ezek szatellittel rendelkeznek. A 2H és a 4H árpakromoszómák GAA mintázata jellegzetes, az ezen a vonalon megfigyelttől teljesen eltérő. A 3H árpa kromoszóma a hosszú kar végén előforduló három HvT01 sáv alapján jól felismerhető. Az 1H addíciós vonalról a korábbi megfigyelések alapján feltételeztük, hogy sterilitást okoz. Ez a vonal fertilis volt, ezért kizártuk az 1H a kromoszómát. A 7H kromoszómán térképezett és tesztelt mikroszatellit markerek közül egyikkel sem kaptuk a várt terméket, ezért a következő lépésben ismételt FISH-t végeztünk a HvT01 és a pTa71 DNS próbák kombinálásával. A FISH eredményeként megállapítottuk, hogy ebben a vonalban egy pár 1HS izokromoszómapár fordul elő. A pTa71 riboszómális DNS próba elsősorban a szatellittel rendelkező kromoszómák (6H, 5H) NOR régiójához hibridizál, de gyengébb jelek az 1H, 7H és 2H kromoszómák rövid karjának intersticiális régiójában is megfigyelhetők. A két szatellittel rendelkező kromoszóma után az 1H kromoszómán figyelhető meg a legintenzívebb jel (Leitch és Heslop-Harrison, 1992). A pTa71 próba az addicionált árpa kromoszóma mindkét karjának intersticiális régiójához, a HvT01 próba pedig a telomérákhoz teljesen szimmetrikusan hibridizált (10. ábra). A pTa71 szignál erőssége megfelelt az 1H kromoszóma rövid karján várhatónak. A HvT01 és a pTa71 próbákkal végzett FISH bebizonyította, hogy ez a vonal egy 1HS izokromoszómát hordoz diszómás állapotban. Az 1HS kromoszóma jelenlétét az 1HS-en térképezett Bmac02131 marker is megerősítette. Az 1H kromoszóma hosszú karján térképezett HVHVA1 marker viszont feltételezéseinknek megfelelően nem adott jelet. Ez a vonal hosszú, laza kalásszal rendelkezik, amelyen szálkacsőkevények láthatók. Ebből a vonalból eddig 3 növényt neveltünk fel fitotronban, kontrollált körülmények közt. A növények fertilitása jó, így a továbbiakban vizsgálható majd ennek a vonalnak a stabilitása, illetve felhasználható további genetikai kísérletekhez.



9. ábra A 3H Mv9 kr1/Igri addíciós vonal szomatikus kromoszómái a HvT01 DNS próbával végzett fluoreszcens *in situ* hibridizáció után. A HvT01 próbát fluororeddel jelöltük (piros), a DAPI kontrasztfestés következtében a kromoszómák kékek. A 3H kromoszóma rövid karján egy telomérás, a hosszú karján egy telomérás és két szubtelomérás sáv látható.



10. ábra. Az 1HS izokromoszómát diszómás állapotban hordozó Mv9 kr1/Igri addíciós vonal szomatikus kromoszómái a HvT01 (piros) és a pTa71 DNS (sárgászöld) próbákkal végzett FISH után. Az 1HS árpakromoszómák mindkét végén HvT01 jel látható, és szimmetrikusan két gyengébb intersticiális pTa71 jel is megfigyelhető.

7. táblázat

Az Mv9 kr1/Igri búza/árpa diszómás addíciós vonalak fertilitása és morfológiai adatai
(2005, Martonvásár, Tükrös)

Genotípus	Fertilitás (szem/ kalászká)	Növény- magasság (cm)	Bokrosodás (kalász/növény) (db)	Főkalász hossza (cm)	Kalászká/ főkalász (db)	Szem/ főkalász (db)
Mv9kr1	2,687	79,1	9,4	10,6	21,8	56,5
Igri	0,815	103,8	13,7	9,8	30,2	24,5
2H	1,351**	89,5**	9,8	11,35*	18,6**	25,1**
3H	1,710**	71,4**	11,2	8,45**	17,8**	30,7**
4H	2,615	68,4**	6,9*	9,85*	20,3	53,0

*, **, $P > 0,05$ illetve $> 0,01$ szinten szignifikánsan különböznek az Mv9 kr1 búzatörzstől

4.1.4.2. Asakaze komugi/Manasz addíciós vonalak létrehozása

Az Asakaze komugi \times Manasz hibridből szövettényészetben regenerált utódokon Asakaze komugi búzafajtával végzett megporzáskor annak ellenére nem kaptunk egyetlen egy BC₁ szemet sem, hogy igen nagyszámú virágot (összesen 3150-et) poroztunk meg búzával. Az Mv9 kr1 búzatörzsszel végzett megporzásból azonban 3 embriót tudtunk kipreparálni (2. táblázat). A 3 embrió közül egyből akkora növényke fejlődött, amelyet már talajba ültethettünk, az azonban kiültetés után három héttel elpusztult. A hibrid fenntartása miatt a regeneránsok fejlődő kalászkezdeményeit táptalajon *in vitro* elkalluszosítottuk és két egymást követő ciklusban megismételtük a hibridek elszaporítását szövettényészetben. Különböző búzafajtákkal (Chinese Spring, Martonvásári 9 kr1, Asakaze komugi) a regeneráns hibridek több ezer virágát megporoztuk, míg végül a harmadik *in vitro* szaporítási ciklusban a Chinese Spring búzafajtával 1502 virág megporzása után egy darab BC₁ növényt kaptunk (8. táblázat).

8. táblázat

Az Asakaze komugi \times Manasz hibridből regenerált utódok visszakeresztése búzával

<i>In vitro</i> nemzedék	Regeneránsok száma		Megporzó búzafajta	Megporzott		Embrió	Növény
	Kiültetett	felnevelt		kalászkok	virágok		
R ₁	148	124	A. komugi	114	3248	0	0
			Mv9 kr1	45	1258	3	1
			CO4-1	18	462	0	0
			Egyéb (12	41	1128	0	0
			fajta)				
R ₂	134	129	A. komugi	44	1540	0	0
			Mv9 kr1	113	4147	0	0
R ₃	105	101	A. komugi	60	2191	0	0
			Mv9kr1	85	2956	1	0
			Chinese	45	1502	1	1
			Spring				

A BC₁ növényt fitotronban felneveltük és búzával (Chinese Spring, Asakaze komugi) végzett ismételt megporzással azon 26 db BC₂F₁ szemet kaptunk. Közülük 20 db BC₂F₁ szem a Chinese Spring, 6 db BC₂F₁ szem pedig az Asakaze komugi búzafajtajával végzett visszakeresztésekből származott. A BC₂F₁ szemeket csíráztattuk és GISH-sel meghatároztuk, hogy azok hány árpa kromoszómát tartalmaznak. A 26 BC₂F₁ szem közül 16-ot tudtunk felnevelni, mert 5 szem nem csírázott és 5 növény pedig a kiültetés után elpusztult. GISH-sel kimutattuk, hogy a BC₂F₁ utódok 1-3 egész árpa kromoszómát tartalmaztak, két növényben deléciós árpa kromoszómát találtunk, egy növény pedig egy búza-árpa transzlokációs kromoszómát tartalmazott (9. táblázat). A 16 felnevelt BC₂F₁ növényből 11 volt fertilis, így az azokon kapott szemek képezték a kiindulási alapját az Asakaze komugi/Manasz addíciós vonalak előállításának, azaz a későbbiekben a Manasz hatsoros árpafajtából történő génátvitelnek a búzába.

9. táblázat

Az Asakaze komugi \times Manasz hibrid búzával kétszeresen visszakeresztett utódainak fertilitása és az egyes növényekben kimutatható árpa kromoszómák azonosítása GISH-sel és mikroszatellit markerekkel.

BC ₂ F ₁ növény* sorszáma	A GISH-sel kimutatott árpa kromoszómák száma	A mikroszatellit markerekkel azonosított árpa kromoszómák	Szem/növény (önmegporzáskor)
03185	nd	1H, 4H, 7H	0
03186	3	4H, 6H, 7H	24
03187	1	-	112
03188	2	6H, 7H	14
03189	3	1H, 4H	0
03190	2+d	1H, 2H, 3HS	0
03191	2	a növény elpusztult	
03192	1tr	3HS	128
03193	3	a növény elpusztult	
03194	3	2H, 3H, 6H	76
03198	1	6H	3
03199	1	7H	13
03200	1	3H	10
03201	1	4H	103
03202	3	1H, 2H	0
03205**	1	a növény elpusztult	
03206**	1	4H	52
03207**	3	a növény elpusztult	
03208**	2	6H, 7H	25
03209**	3+d	1H, 2H, 4H, 5HS	0
03210**	1	a növény elpusztult	

*Az első és a második visszakeresztés is a Chinese Spring búzafajtával történt, kivéve a

** -gal jelölt 03205-03210 számú BC₂F₁ növényeket, ahol a második visszakeresztést az Asakaze komugi búzafajtával végeztük.

Az Asakaze komugi × Manasz hibridek szövettanyészetben, több egymást követő ciklusban regenerált utódainak meiózis elemzése GISH-sel

Az Asakaze komugi × Manasz hibrid három ciklusban regenerált utódainak genomösszetételét részletesen elemeztük a meiózis I. metafázisában GISH-sel. Azt vizsgáltuk, hogy a több ciklusban, több éven át tartó *in vitro* szaporítás során a hibridből eliminálódnak-e az árpa kromoszómák, történnek-e átrendeződések a két genom kromoszómái közt, illetve milyen egyéb rendellenességek, kromoszómatörések jönnek létre. Megállapítottuk, hogy a három egymást követő *in vitro* szaporítási ciklus után is a legtöbb sejtben jelen volt még mind a hét árpa kromoszóma, habár rendellenességek előfordultak (10. táblázat). A kromoszómakar asszociációk száma a harmadik *in vitro* szaporítási ciklus után megnőtt. Kromoszómatöréseket figyeltünk meg, az árpa telocentrikus kromoszómák száma a harmadik ciklus után szignifikánsan megnőtt. A harmadik ciklus után 7 db amfidiploid sejtet figyeltünk meg, melyek kromoszómaszáma 56 lett, de ezeket kihagytuk a 10. táblázat adatai közül, mert az átlagértékeket erősen eltorzították volna. A harmadik *in vitro* ciklus után az egyik hibridben egy reciprok búza-árpa transzlokációt figyeltünk meg (11.a, b ábra).

A kromoszómakar asszociációk többsége a búza kromoszómák közt jött létre (72,2-84,7%-a az összesnek) (11. táblázat). A búza-árpa kromoszómakar asszociációk száma megnőtt a második és a harmadik *in vitro* ciklus után (az összes kiazma 16,3 és 13,8%-át tették ki). A búza-árpa transzlokációs kromoszóma és egy búza kromoszóma közt megfigyelt párosodás esetében a két búza kromoszómakar közt jött létre párosodás, így ez nem növelte a búza-árpa kromoszómakarok közti párosodások számát.

10. táblázat

Az Asakaze komugi \times Manasz hibrid szövetyenyészetben, három egymást követő ciklusban (R_1 , R_2 , R_3) regenerált utódainak sejtenkénti átlagos kromoszóma-párosodása (a szélső értékek zárójelben találhatóak) a meiózis I. metafázisában genomikus *in situ* hibridizációval elemezve.

Regenerált nemzedék	Vizsgált	Búza kromoszómák				Árpa kromoszómák				Búza-árpa		Sejtenkénti
	sejtek/ növények	Univalens	Bivalens		Trivalens	Telo- centrikus	Univalens	Bivalens	Telo- centrikus	Bivalens	Transz- lokáció	kromoszóma- kar asszociációk
	száma		nyílt	zárt								
R ₁	52/4	18.5 (12-21)	0.99 (0-4)	0.06 (0-2)	0.09 (0-1)	0.03 (0-2)	5.98 (1-7)	0.06 (0-1)	0.96 (0-8)	0.13 (0-1)	0.03 (0-1)	1.63 (0-8)
R ₂	107/6	18.8 (7-21)	0.76 (0-4)	0.19† (0-5)	0.04 (0-1)	0.06 (0-4)	6.19 (0-7)	0.12† (0-1)	0.93 (0-14)	0.27† (0-3)	0.0 (0)	1.65 (0-12)
R ₃	95/6	18.1 (7-21)	0.82 (0-4)	0.29* (0-6)	0.03 (0-1)	0.06 (0-6)	5.16† (1-7)	0.17* (0-2)	1.93† (0-14)	0.25† (0-3)	0.26† (0-2)	1.89 (0-13)
SzD _{5%}		0.8325	0.4434	0.0550	0.1282	0.0729	0.0162	0.0239	0.1051	0.0878	0.0019	0.549

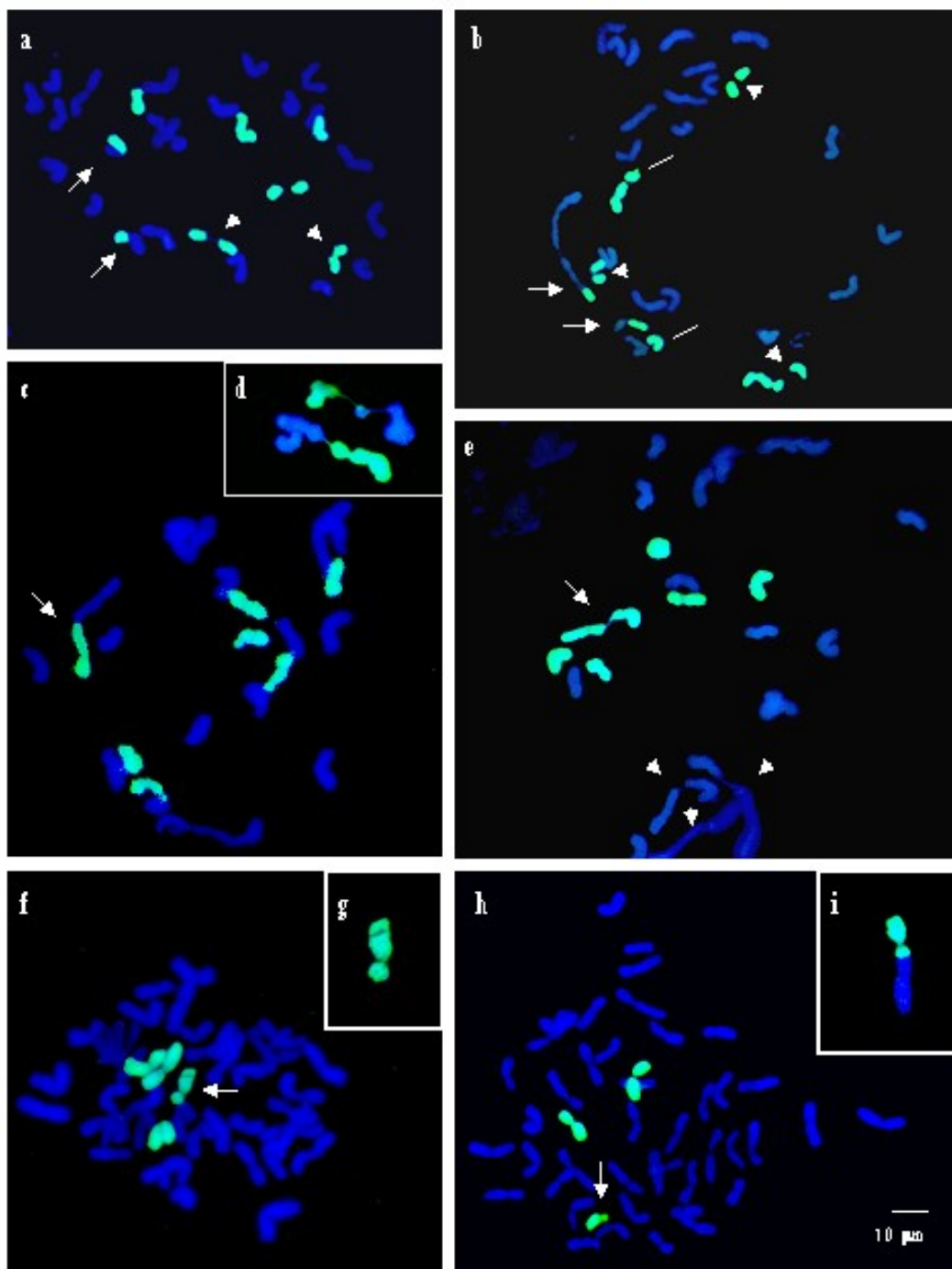
†, * szignifikánsan különbözik az R_1 generációtól $P=0.1$ és $P=0.05$ szinten

Az árpa kromoszómák azonosítása a BC₂ nemzedékben

A második visszakeresztezés után az Asakaze komugi × Manasz hibrid utódaiban GISH-sel vizsgáltuk, hogy azok hány árpa kromoszómát tartalmaznak. Két növény a teljes árpakromoszómák mellett deléciós kromoszómákat is tartalmazott (11.f-h ábra). Mindkét esetben a deléciós töréspont a centromérához közel helyezkedett el. Az egyik növényben a deléciós töréspont egy szatellit árpa kromoszóma hosszú karján volt megfigyelhető, amely az 5H vagy a 6H. Egy másik növényben egy dicentrikus búza-árpa transzlokációt mutattunk ki (11.i ábra).

Az árpa kromoszómákat mikroszatellit markerek segítségével azonosítottuk. Vizsgálatainkban 20 mikroszatellit markert használtunk, amelyeket korábban a 7 árpa kromoszóma rövid és hosszú karján lokalizáltak (Ramsay és mtsai, 2000). A GISH-sel kimutatott árpa kromoszómák száma többnyire megegyezett a mikroszatellit markerekkel azonosított árpa kromoszómák számával, kivéve három növényt. A 03187 sorszámú növényben GISH-sel egy árpa kromoszóma volt látható, azonban a vizsgált mikroszatellit markerek egyike sem adott jelet. Két másik növényben (03189, 03202) GISH-sel három árpa kromoszómát mutattunk ki, azonban mikroszatellit markerekkel csak kettő jelenlétét tudtuk detektálni. A búza-árpa dicentrikus transzlokációt hordozó (03192) és az egyik deléciós kromoszómát tartalmazó növényben (03190) a 3HS kromoszómakaron lokalizált HvLTPPB marker a várt PCR terméket adta (12. ábra), viszont a 3HL kromoszómakaron lokalizált Bmag0013 nem adott jelet. Ebből arra következtettünk, hogy mindkét növényben a 3HS kromoszómakar jelen van, de a 3HL hosszú kar nagy része hiányzik. A deléciós töréspont és a transzlokációs töréspont is a két kromoszómában a hosszú karon a $\pm 0,3$ frakció hosszúságnál helyezkedett el.

A 03209 sorszámú növényben a deléciós kromoszómát a Bmac0306 5HS marker segítségével 5H-nak határoztuk meg. A kromoszómatörés ebben a növényben az 5H kromoszóma hosszú karján a $\pm 0,3$ frakció hosszúságnál ment végbe. A vizsgált mikroszatellit markerek közül az 5H hosszú karon a Bmag0337 található legközelebb a centromérához (D. Nagy és mtsai, 2002). Az 5H hosszú karon lokalizált Bmag0337, Bmag0394, Bmag0323, Bmac 0096 és az Ebmac0824 markereket vizsgáltuk, hogy a deléciós kromoszómát hordozó növényben kimutathatók-e. Egyik markerrel sem kaptunk árpa specifikus terméket, amelyből arra következtethetünk, hogy ezek a markerek a deléciós törésponttól disztális irányban, a kromoszóma végén helyezkednek el.



11. ábra Genomikus *in situ* hibridizáció az Asakaze komugi × Manasz hibrid meiózisének I. metafázisában (a-e) és a BC₂ utódok szomatikus kromoszómáin mitózisban (f-i). Próbaként Fluorogreen-nel jelölt teljes árpa genomikus DNS-t használtunk, így az árpa kromoszómák sárgászöldek, a DAPI kontrasztfestés következtében a búza kromoszómák kékek.

a, Hat árpa univalens (kettő miszdivízióval kettévált, nyílhegygel jelölve), két búza-árpa transzlokációs univalens kromoszóma (nyilakkal jelölve). b, Öt árpa univalens (három

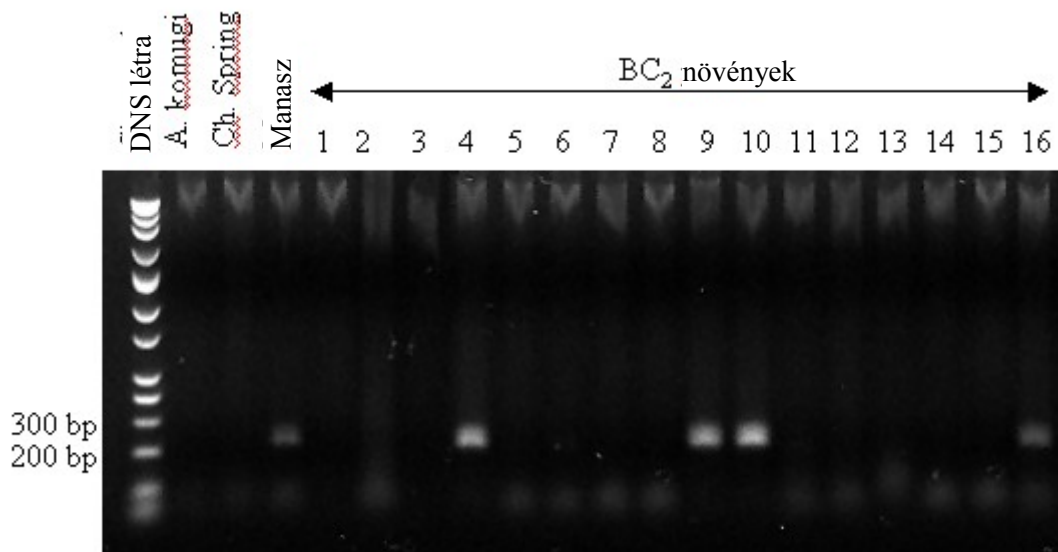
miszdivízióval kettévált, nyílhegyekkel jelölve), két árpa telocentrikus kromoszóma (vonalakkal jelölve), egy búza-árpa transzlokációs kromoszóma és egy búza kromoszóma párosodása következtében létrejött nyílt bivalens (nyíllal jelölve), egy búza-árpa transzlokációs univalens (nyíllal jelölve). c, Egy búza-árpa nyílt bivalens (nyíllal jelölve). d, Két búza-árpa bivalens (egy másik sejtől kiemelt részlet). e, Egy árpa nyílt bivalens (nyíllal jelölve), három búza nyílt bivalens (nyílhegyekkel jelölve). f, Három teljes és egy deléciós (nyíllal jelölve) árpa kromoszóma egy BC₂ növény mitotikus sejtjében. g, Terminális delécia egy szatellittel rendelkező árpa kromoszóma hosszú karján egy BC₂ növényben. h, Két egész és egy deléciós (nyíllal jelölve) árpa kromoszóma egy másik BC₂ növény mitózisában. i, Egy dicentrikus búza-árpa transzlokáció egy BC₂ növényben.

A 16 BC₂ növényben mikroszatellit markerekkel összesen 30 árpa kromoszómát (szegmentumot) mutattunk ki. Hat növényben volt jelen a 4H kromoszóma, ötben az 1H, 6H és a 7H. Négy növényben detektáltuk a 2H és a 3H kromoszómát, illetve az utóbbinak egy szegmentumát. Sajnos egy növényben sem tudtuk kimutatni a teljes 5H kromoszómát, csak egy 5H deléciós kromoszómát találtunk egy növényben, amely steril lett. Az 1H kromoszómát hordozó növények mind sterilek lettek, így összesen 11 BC₂ növényen kaptunk öntermékenyítéssel szemeket.

11. táblázat

A sejtenkénti átlagos kromoszómakar asszociációk száma a három egymást követő ciklusban *in vitro* regenerált Asakaze komugi × Manasz hibridek pollenanyasejtjeiben, genomikus *in situ* hibridizációval végezve a kromoszómák azonosítását.

<i>In vitro</i> nemzedék	Búza-búza	Búza-árpa	Árpa-árpa	Összes
R ₁	1.38 (84.7%)	0.13 (7.9%)	0.12 (7.4%)	1.69 (100%)
R ₂	1.26 (76.4%)	0.27 (16.3%)	0.12 (7.3%)	1.65 (100%)
R ₃	1.46 (72.2%)	0.26 (13.8%)	0.17 (9.0%)	1.89 (100%)



12. ábra A 3HS kromoszómakaron lokalizált, HvLTPPB árpa mikroszatellit marker előfordulása az Asakaze komugi × Manasz búza-árpa hibridek BC₂ utódaiban és a szülőpartnerekben.

A BC₂ növények öntermékenyített utódai közül kiválogatott diszómás és monoszómás addíciók

Az Asakaze komugi × Manasz búzával visszakeresztezett utódai közül a dicentrikus transzlokációt hordozó növény mellett a 4H monoszómás addíción kaptuk öntermékenyítés után a legtöbb szemet. A 4H monoszómás addíción (03201) kapott szemeket csíráztattuk és GISH-sel elemeztük, hogy az utódszemekbe hány árpa kromoszóma adódott át. A szemek jelentős részéből kiesett az árpa kromoszóma, de nagyon sok növényben újra detektálható volt az egy árpa kromoszóma. A monoszómás addíciók utódait ismét felnevelve, végül 130 vizsgált utódszem közül 3 db diszómás addíciót tudtunk kiválogatni. A 4H diszómás addíció kalásza (13. ábra) hasonló a 4H Mv9kr1/Igri kalászához, de annál sokkal hosszabb szálkával rendelkezik. A kalász felső harmada tömöttebb, a kalász alsó harmada lazább. A növények átlagos magassága 68,3 cm lett. A növények hosszú kalászokkal rendelkeztek, a főkalász hossza átlagosan 13,6 cm volt, amelyeken 23 kalászska helyezkedett el és azokon 70,6 szem volt.



13. ábra Asakaze komugi/Manasz 4H diszómás addíció kalásza

A 3H, 6H és a 7H árpa kromoszómát tartalmazó BC₂ növényeken kapott szemeket csíráztatva eddig az utódok közt nem találtunk diszómás addíciókat, de mindegyik növényen kaptunk olyan szemeket, amelyek az egy árpa kromoszómát továbbra is tartalmazták, így azok nem vesztek el. Ezekből a vonalakból több monoszómás addícióval rendelkezve a következő generációban nagyobb az esély a diszómás addíciók megtalálására.

A Manasz hatsoros őszi ukrán árpafajtával előállított hibrid utódai közül eddig a 4H árpa kromoszómát diszómás addíció, a 3H, 6H és 7H kromoszómákat pedig monoszómás addíció formájában hordozó növényeket válogattunk ki.

A 2H kromoszóma kiválogatását a 03194 sorszámú növényből tervezzük, amely a 2H árpa kromoszóma mellett hordozza a 3H és a 6H kromoszómákat. Ezen a növényen 76 szemet kaptunk, így van esélyünk arra, hogy az utódok közt esetleg akár diszómás addíciókat is találjunk.

Az 1H árpa kromoszómát és az egyetlen 5HS deléciók kromoszómát hordozó növények sterilek lettek, így ezek a kromoszómák nem adódtak át utódokba.

4.1.5. Búza/árpa transzlokációs vonalak létrehozása

Az őszi búza \times őszi árpa hibridek előállítása előtt, kezdetben a már ismert keresztezhető Chinese Spring tavaszi búzafajta és a Betzes tavaszi árpafajtával hoztunk létre hibridet (Molnár-Láng és Sutka, 1994), amelyet az előzőekhez hasonlóan szövettényészetben elszaporítottunk. Az eredeti Chinese Spring \times Betzes hibridből 122 regeneráns hibrid utódot neveltünk fel. A felnevelt regeneráns hibridek közül 12 növényen összesen 384 virágot poroztunk meg az Mv9 kr1 búzatörzsszel és két szemet kaptunk. A két búzával visszakeresztezett utódon Mv9 kr1 búzatörzsszel végzett ismételt megporzás során 47 BC₂F₁szemet kaptunk. A BC₂F₁ növényeken önmegporzással kapott szemeket elemeztük GISH-sel. Összesen 51 szemet vizsgáltunk, melyek közt 12-ben tudtunk búza-árpa transzlokációkat kimutatni (12. táblázat).

Az egyik BC₂F₁ növényen 4 szemet kaptunk, melyek mindegyike tartalmazott búza-árpa transzlokációt. A négy utódban kétféle transzlokációt figyeltünk meg. Az egyik transzlokációban egy árpa kromoszóma-szegmentum átépülését figyeltük meg egy búza kromoszómára. A transzlokációs töréspont a $\pm 0,50$ frakció hosszúságnál található (TT). (14.b ábra). A második transzlokációban egy búza kromoszóma-szegmentum épült át egy szatellites árpa kromoszómára (14.a ábra). Az 5H és a 6H árpa kromoszómák rendelkeznek szatellittel, így a transzlokációs töréspont az 5H vagy a 6H kromoszóma hosszú karján a $\pm 0,20$ frakció hosszúságnál jött létre. Az átépült búza kromoszóma-szegmentum rövidebb mint a hiányzó árpa kromoszóma szakasz. Ezt a transzlokációs kromoszómát hordozó növények a kiültetés után rövidesen elpusztultak. A bokrosodási fázisig a növények fejlődtek, majd a fejlődésük megállt, a növények elsárgultak és elpusztultak. A négy szemből egyet tudtunk felnevelni. Ez a növény a transzlokáció mellett két egész és egy telocentrikus árpa kromoszómát tartalmazott (14.b ábra). A transzlokációs növényen 111 szemet kaptunk öntermékenyítéssel.

További négy BC₂F₁ növényen kapott szemek közt találtunk búza-árpa transzlokációt hordozó utódokat. Két különböző BC₂F₁ növényen kapott szemek közt találtunk centrikus fúziót (14.c ábra). A kromoszóma rövid karja az árpából, a hosszú karja a búzából származott. A transzlokáció mellett más árpa kromoszómák is előfordultak. A centrikus fúziót tartalmazó növények fertilitása jó volt, a négy növényen összesen 409 (80, 121, 109, 99 szem/növény) szemet kaptunk.

12. táblázat

A búza-árpa transzlokációkat hordozó egyedek száma a szövettényészetben elszaporított Chinese Spring \times Betzes hibridek BC₂F₂ utódai közt

BC ₂ F ₁ növény ^(a) sorszáma	GISH-sel vizsgált BC ₂ F ₂ növények száma	A búza-árpa transzlokációkat hordozó egyedek száma	A transzlokáció típusa (Növények száma) ^(b)
1/33	2	-	-
1/25	4	4	TT(4); TS(2)
1/31	1	-	-
1/5	2	-	-
1/8	5	-	-
1/28	1	-	-
2/2	4	-	-
2/4	5	3	TT*(3)
2/6	2	-	-
2/10	2	-	-
2/13	3	-	-
2/17	4	3	CF(3)
2/19	2	-	-
2/21	4	-	-
2/23	3	1	CF(1)
2/26	4	-	-
2/27	3	1	TT**(1)

^a. Az 1/5-33 jelű BC₂F₁ növények az első BC₁, a 2/2-27 jelű növények viszont a második BC₁ növényről származtak.

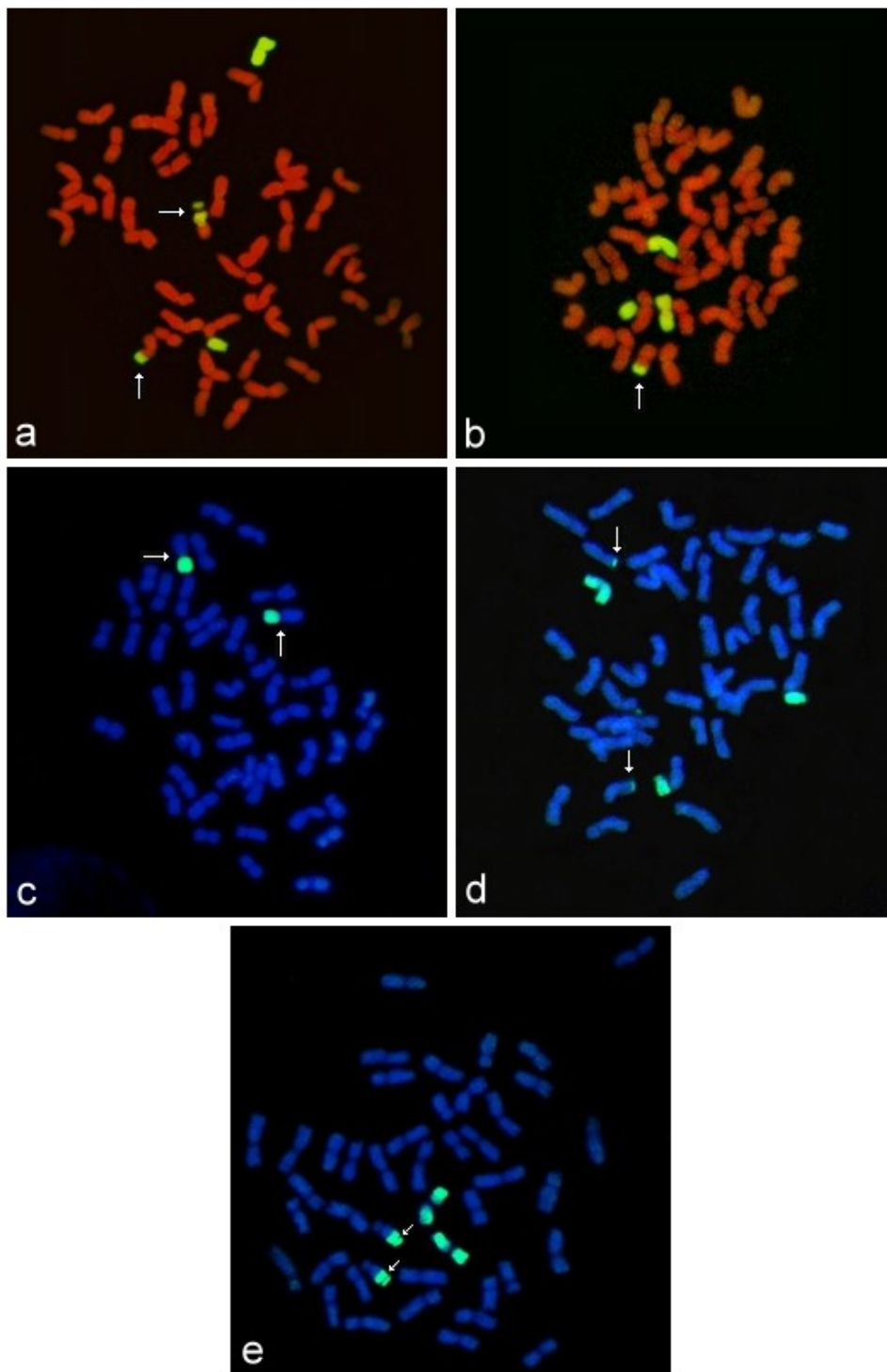
^b. TT: egy árpa kromoszóma-szegmentum átépülése egy búza kromoszómára, a transzlokációs töréspont a $\pm 0,50$ frakcióhosszúságnál (FL) található

TS: egy búza kromoszóma-szegmentum átépülése egy árpa kromoszómára, a transzlokációs töréspont egy szatellites árpa kromoszóma hosszú karján a $\pm 0,20$ frakcióhosszúságnál található

CF: centrikus fúzió

TT* egy szatellites árpa kromoszóma-szegmentumának átépülése egy búza kromoszómára, a transzlokációs töréspont $\pm 0,50$ frakcióhosszúságnál látható

TT** egy árpa kromoszóma-szegmentum átépülése egy búza kromoszómára, a transzlokációs töréspont a kromoszómakaron a $\pm 0,80$ frakcióhosszúságnál látható



14. ábra Genomikus *in situ* hibridizáció az *in vitro* regenerált Chinese Spring \times Betzes hibrid Martonvásári 9kr1 búzatörzsszel visszakeresztett utódainak szomatikus kromoszómáin mitózisban. Teljes genomikus árpa DNS-t használtunk próbaként, melyet Fluorogreennel jelöltünk, így az árpa kromoszómák (szegmentumok) sárgászöldek. A búza kromoszómák kontrasztfestését propidium jodiddal (piros-a,b) és DAPI-val (kék-c,d,e) végeztük. a, Két

különböző búza-árpa transzlokációs kromoszóma (nyilakkal jelölve), egy egész és egy telocentrikus árpa kromoszóma egy BC_2F_2 növényben. b, Egy búza-árpa transzlokációs kromoszóma (nyíllal jelölve), két egész és egy telocentrikus árpa kromoszóma egy másik BC_2F_2 növényben. c, Homozigóta búza-árpa centrikus fúzió (nyilakkal jelölve) egy BC_2F_3 növényben. d, Homozigóta búza-árpa transzlokáció (nyilakkal jelölve) egy másik BC_2F_3 növényben, mellette egy egész és két telocentrikus árpa kromoszóma. e, Homozigóta búza-árpa transzlokáció (nyilakkal jelölve) és két árpa kromoszóma egy BC_2F_3 növényben. A transzlokálódott árpa kromoszóma-szegmentumok szatellit kromoszómákból származnak.

A következő transzlokációban egy szatellit árpa kromoszóma rövid karjának kb. 50%-a származott az árpából (14.e ábra). Úgy tűnt, hogy a kromoszóma másik karjának egy jelentős darabja letört és elveszett. Ez a transzlokáció három utód növényben volt megfigyelhető, melyek közül egy steril lett, de a másik kettőn összesen 174 szemet kaptunk. Az ötödik típusú transzlokációban egy kisméretű árpa kromoszóma-szegmentum épült át egy búza kromoszómára (14.d ábra). A transzlokációs töréspont a $\pm 0,80$ frakció hosszúságnál volt megfigyelhető. Ezen a növényen 183 szemet kaptunk.

Homozigóta búza-árpa transzlokációkat hordozó utódok kiválogatása

A BC_2F_3 generációban homozigóta búza-árpa transzlokációkat hordozó egyedeket válogattunk ki (13. táblázat). A homozigóta transzlokációkat tartalmazó növények előfordulási gyakorisága a vártnál kisebb volt, de a transzlokációs kromoszóma átadódási gyakorisága még így is viszonylag nagy volt. Négy különböző transzlokációs vonalból 1-3 homozigóta transzlokációt tartalmazó növényt találtunk. Az egyik típusú transzlokációt hordozó növény elpusztult (TS: egy búza kromoszóma-szegmentum átépülése egy árpa kromoszómára, a transzlokációs töréspont egy szatellit árpa kromoszóma hosszú karján a $\pm 0,20$ frakcióhosszúságnál található), így ebből nem kaptunk utódokat. A többi négy homozigóta búza-árpa transzlokációt hordozó növény a transzlokáció mellett még más árpa kromoszómákat is tartalmazott. Mindegyik homozigóta transzlokációs vonalon kaptunk öntermékenyítéssel szemeket, így a következő generációkban lehetségessé vált olyan utódok kiválogatása, amelyek a transzlokációk mellett már nem tartalmaztak más árpa kromoszómát.

13. táblázat

Homozigóta búza-árpa transzlokációkat tartalmazó egyedek kiválogatása a heterozigóta transzlokációkat hordozó (Chinese Spring \times Betzes) \times Mv9 kr1 BC₂F₂ növények öntermékenyített utódai közül

BC ₂ F ₂ növény sorszama	A transzlokáció típusa	Vizsgált BC ₂ F ₃ növények száma	Transzlokációt nem tartalmazó növények száma	Heterozigóta transzlokációt hordozó növények száma	Homozigóta transzlokációt hordozó növények száma
10	TT	12	2	7	3
24	TT*	46	26	18	2
40	CF	16	9	6	1
41	CF	3	1	-	2
70	TT**	24	13	10	1

TT: egy árpa kromoszóma-szegmentum átépülése egy búza kromoszómára, a transzlokációs töréspont a $\pm 0,50$ frakcióhosszúságnál (FL) található

CF: centrikus fúzió

TT* egy szatellites árpa kromoszóma-szegmentumának átépülése egy búza kromoszómára, a transzlokációs töréspont $\pm 0,50$ frakcióhosszúságnál látható

TT** egy árpa kromoszóma-szegmentum átépülése egy búza kromoszómára, a transzlokációs töréspont a kromoszómakaron a $\pm 0,80$ frakcióhosszúságnál látható

Búza/árpa transzlokációk azonosítása FISH-sel repetitív DNS próbákkal és mikroszatellit markerekkel

A búza kromoszómák (szegmentumok) azonosítása egymást követő GISH-sel és FISH-sel, a pSc119.2 és a pAs1 DNS próbákkal

A Chinese Spring \times Betzes hibrid *in vitro* regenerált utódain Mv9 kr1 búzatörzzsel végzett kétszeres visszakeresztezésből a BC₂F₃ nemzedékben négyféle homozigóta transzlokációt hordozó vonalat válogattunk ki (13. táblázat). A négyféle homozigóta transzlokáció mellett az Mv9 kr1 \times Igri hibrid szövettényészetben regenerált, majd Mv9 kr1 búzatörzzsel visszakeresztezett utódai közt is találtunk egy transzlokációt, amelyből a következő generációban egy homozigóta transzlokációt hordozó növényt sikerült kiemelnünk. Az összesen öt homozigóta transzlokációt tartalmazó vonalban egymást követő GISH-sel és repetitív DNS próbák (pSc119.2, pAs1) felhasználásával végzett FISH-sel azonosítottuk a búza kromoszómákat, az árpa kromoszóma-szegmentum eredetét pedig mikroszatellit markerek segítségével határoztuk meg. Mind az öt transzlokációs vonalban az árpa kromoszóma-szegmentum terminálisan kapcsolódott egy búza kromoszóma-hoz.

Az első transzlokációs búza vonal (TL1) kromoszómaszáma 42 volt. A transzlokációs töréspont 0,5 frakcióhosszúságnál helyezkedett el (TT). Egymást követő GISH és FISH segítségével megállapítottuk, hogy a transzlokációs töréspont a 2D búza kromoszóma hosszú karján található (15.a,b ábra). A 2D kromoszóma jól felismerhető a rövid kar végén elhelyezkedő erős terminális pSc119.2, egy pAs1 szubterminális jel, továbbá a centroméránál és a hosszú karon intersticiálisan elhelyezkedő pAs1 jelek alapján. A hosszú karon a két pAs1 sávot tartalmazó búza kromoszóma-szegmentum eliminálódott. Az átépült árpa kromoszóma-szegmentum végén is látható egy terminális pAs1 jel. Ez a transzlokáció stabilan öröklődött és több generáción keresztül homozigóta állapotban kimutatható volt.

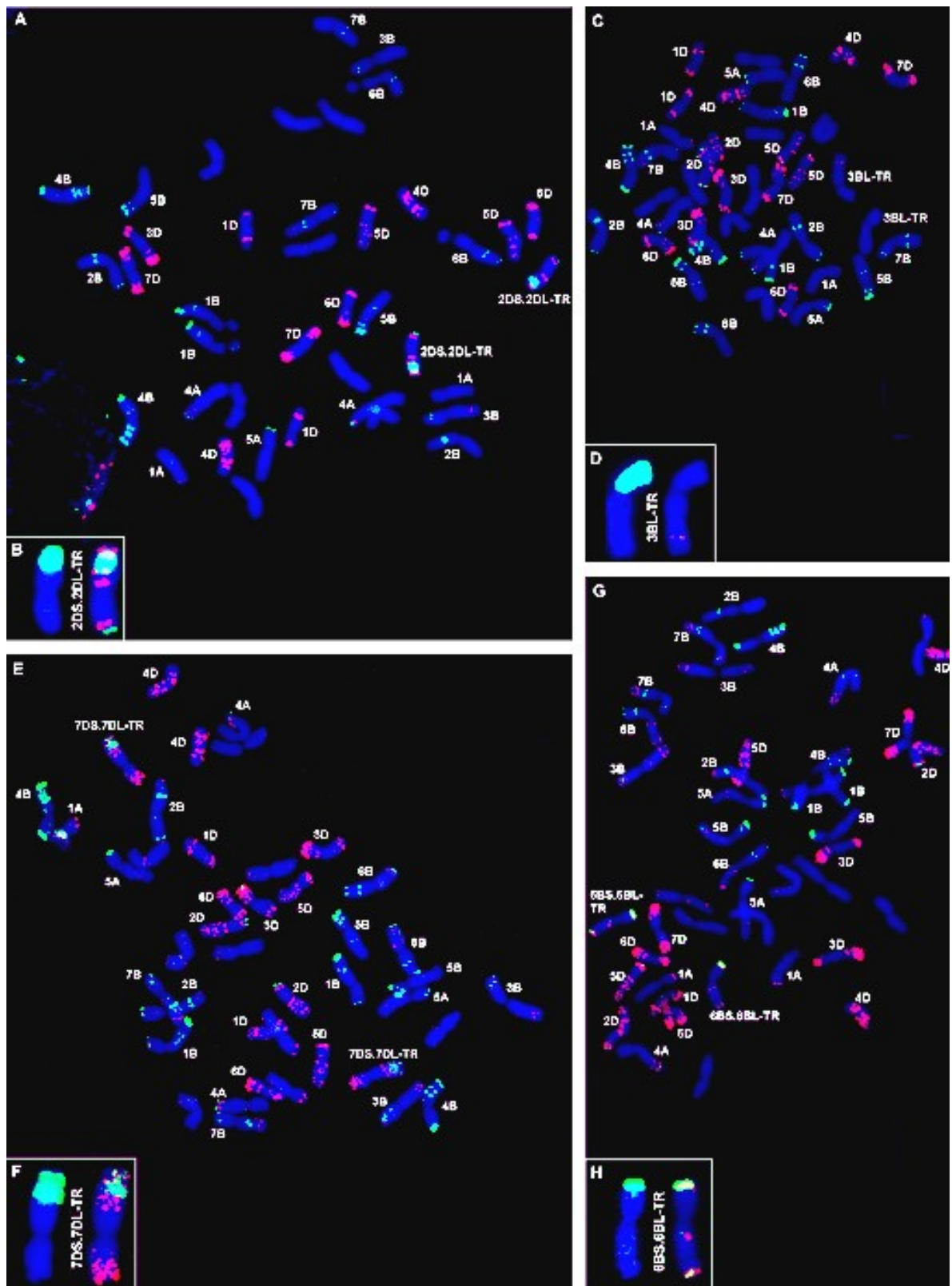
A második transzlokációs vonal (TL2) egy búza-árpa centrikus fúziót (CF) tartalmazott és szintén 42 kromoszómaszámú volt. A két repetitív DNS próbával végzett FISH-sel, számos növény vizsgálatát követően sem tudtuk a teljes 3B kromoszómát azonosítani, holott ezen a kromoszómán a pSc119.2 DNS klónnal végzett hibridizáció után a rövid karon három jellegzetes sáv látható. Feltételeztük, hogy a hiányzó 3B kromoszómából származhat a transzlokáció hosszú karja. Ezt a feltételezést megerősítette a transzlokációs kromoszóma hosszú karján látható szubterminális pAs1 jel is, amely a 3B kromoszóma

hosszú karjára jellemző (15.c,d ábra). Ennek a transzlokációnak az öröklődése stabil volt, több generáción keresztül vizsgált utódokban is jelen volt.

A harmadik búza-árpa transzlokációs vonal (TL3) 44 kromoszómaszámú. A 42 búza kromoszóma mellett ez a vonal még egy búza-árpa transzlokációs kromoszómapárt is tartalmaz (TT**). A transzlokációs kromoszómában résztvevő búza kromoszóma szatellittel rendelkezik, így az vagy a 6B vagy az 1B kromoszóma. A pAs1 DNS próbával két hibridizációs jel található ennek a kromoszómának a rövid karján, ennek alapján megállapítható, hogy az a 6B búza kromoszóma. A transzlokációs töréspont a 6B búza kromoszóma hosszú karján, 0,8 frakcióhosszúságnál található (15.g,h ábra). A transzlokáció öröklődése stabilnak bizonyult, 25 utód GISH-sel végzett elemzése során mind a 25 növényben kimutatható volt ez a transzlokáció.

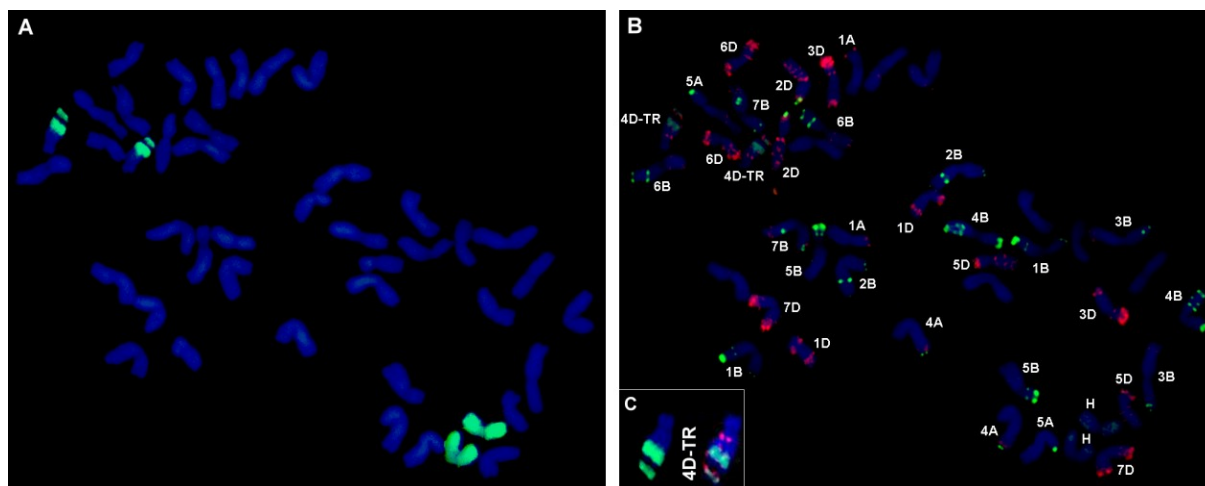
A negyedik transzlokációs vonal (TL4) szintén 44 kromoszómaszámú. A búza-árpa transzlokációval együtt fellelhető 42 kromoszóma mellett ez a vonal még egy pár árpa kromoszómát is tartalmaz (16.a,b,c ábra). A FISH során egyik búza kromoszóma sem hasonlított a 4D kromoszómára, holott ez a kromoszóma a jellegzetes és intenzív pAs1 FISH hibridizációs mintázat alapján jól felismerhető. A transzlokációs kromoszómán a centroméra közelében egy erős pAs1 jel volt látható, amelynek alapján feltehető, hogy a búza kromoszóma-szegmentum a 4D kromoszómából származik. A transzlokációs kromoszóma hosszú karjának egy jelentős része letört, elveszett, amely megnehezíti ennek a kromoszómának az azonosítását. A GISH-sel elemzett utódok 90%-ában ez a transzlokáció homozigóta állapotban kimutatható volt.

Az ötödik transzlokációs vonal (TL5) az Mv9 kr1 × Igri hibridből származott és 42 kromoszómaszámú volt. Egyik teljes búza kromoszóma sem hasonlított a 7D kromoszómára, annak ellenére, hogy ez a kromoszóma a jellegzetes intenzív terminális és szubterminális pAs1 hibridizációs jelek alapján jól felismerhető. A transzlokációs kromoszóma rövid karján egy erős terminális és két gyengébb szubterminális pAs1 hibridizációs jel volt látható. A hosszú karon, közvetlenül az árpa kromoszóma-szegmentum alatt két gyengébb pAs1 hibridizációs jel fordult elő. A FISH hibridizációs mintázat alapján a transzlokációs kromoszómában a búza kromoszóma-szegmentum a 7D kromoszómából eredt (15.e,f ábra). A TL4 és a TL5 vonalakban a beépült árpa kromoszóma-szegmentumokon terminális pAs1 jelek fedezhetők fel. A TL4 és a TL5 vonalakban a beépült árpa kromoszóma-szegmentumok szatellittel rendelkeztek, azaz azok vagy az 5H vagy a 6H árpa kromoszómák rövid karjából származnak.



15. ábra Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) a TL1 (A,B), a TL2 (C,D), a TL3 (G,H) és a TL5 (E,F) búza/árpa transzlokációs vonalak szomatikus kromoszómaín mitózisban. A pSc119.2 (zöld) és a pAs1 (piros) DNS próbákkal azonosított búza kromoszómákat a

megfelelő számmal és betűvel jelöltük, a transzlokációkba (TR) beépült búza kromoszóma-szegmentumokat is. A transzlokációs kromoszóma GISH és azt követő FISH után látható az egész sejtet ábrázoló képek bal sarkában, TL1 (B), TL2 (D), TL3 (H), TL5 (F). A GISH után az árpa kromoszóma-szegmentum sárgászöld, a búza kromoszómák a DAPI kontrasztfestés következtében kék.



16. ábra Egymást követő genomikus *in situ* hibridizáció (GISH) (A) és fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) (B) ugyanazon a sejten a TL4 búza-árpa transzlokációs vonal szomatikus kromoszómáin mitózisban. A GISH során a teljes árpa genomikus DNS-t fluorogreennel jelöltük, így az árpa kromoszómák sárgászöldek. A transzlokációs kromoszómák mellett még egy addicionált árpa kromoszómapár is látható (A). A kromoszómák azonosítását FISH-sel a pSc119.2 (zöld) és a pAs1 (piros) DNS próbával végeztük (B). A transzlokációs kromoszóma egymást követő GISH és FISH után a kép bal sarkában (C) látható.

Az árpa kromoszóma-szegmentumok azonosítása mikroszatellit markerekkel

Összesen 45 árpa mikroszatellit markert használtunk fel a búza-árpa transzlokációkban az árpa kromoszóma-szegmentumok eredetének meghatározására. Öt transzlokációs vonalban, a szülőpartnerekben, a két búza genotípusban (Chinese Spring, Mv9 kr1) és a két árpa fajtában (Betzes, Igri) vizsgáltuk ezeknek a markereknek a jelenlétét illetve a hiányát. A vizsgált markerek közül 13 egyértelműen polimorfnak bizonyult a két árapajta közt.

A TL1 transzlokációs vonalban a GMS021 és a Bmac0213 markerek a várt PCR terméket adták, ezzel bizonyítva, hogy ebben a vonalban az 1HS kromoszóma telomérás

szegmentje van jelen. Így ebben a vonalban a transzlokációs kromoszómát 2DS.2DL-1HS-ként határoztuk meg. A kromoszómatorés kb. az 1HS kromoszómakar felénél ment végbe, a Bmac0213 és a Bmac0032 markerek közt.

A második transzlokációs vonalban (TL2) a 3H kromoszóma rövid karján korábban lokalizált HvLTPBB, Bmag0136 és Bmac0067 marker kimutatható volt. Ennek alapján a centrikus fúziót 3HS.3BL-ként azonosítottuk, azaz ebben az esetben egy kompenzáló transzlokáció jött létre.

A TL3 transzlokációs vonalban a beépült árpa kromoszóma-szegmentum viszonylag kicsi. Egyedül a Bmac0030 markert tudtuk kimutatni ebben a vonalban. Ezt a markert korábban a 4H kromoszóma centroméra körüli régiójában mutatták ki. Saját kísérleteinkben a Chinese Spring/Betzes diteloszómás addíciós vonal felhasználásával megállapítottuk, hogy ez a marker a hosszú karon található. Vizsgálataink alapján összegezhető, hogy a 4H árpa kromoszóma hosszú karjának egy interkaláris szegmense épült át a 6B kromoszóma hosszú karjára. A transzlokációs kromoszómát így 6BS.6BL-4HL-nek azonosítottuk.

A TL4 transzlokációs vonal egy egész árpa kromoszómapárt is tartalmazott a transzlokáció mellett. A 4H árpa kromoszóma mindkét karját reprezentáló öt marker pozitív jelet adott ezen a vonalon, ezzel bizonyítva, hogy az addicionált kromoszómapár a 4H.

Fizikai térképezés

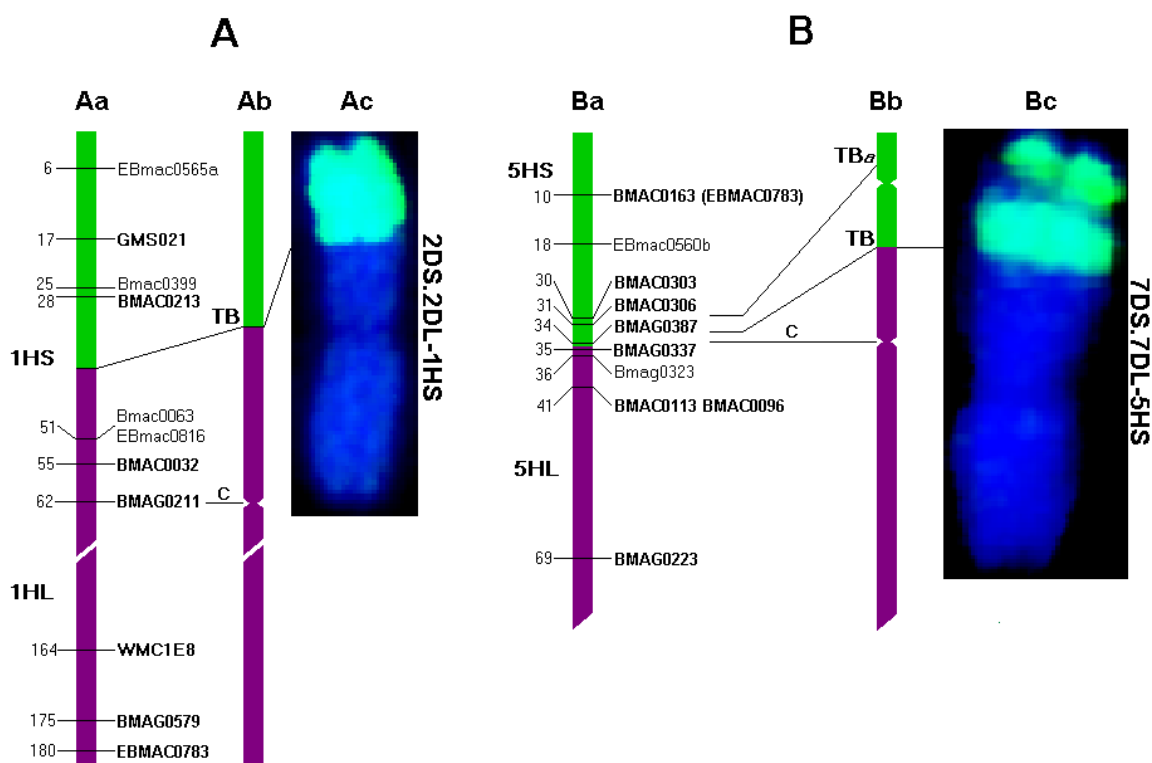
Az 5H árpa kromoszómán lokalizált markerek közül tíz markert vizsgáltunk a búza-árpa transzlokációs vonalakon. A 5H kromoszóma rövid karjának a telomérájától kezdve a hosszú kar telomérájáig elhelyezkedésük sorrendjében ezek a következők voltak: Bmac0163, Bmac0303, Bmac 0306, Bmac0387, Bmag0337, Bmac0113, Bmac0096, Bmag0223, HvLOX és Ebmac0824. A Chinese Spring/Betzes addíciós vonalak segítségével megállapítottuk, hogy a centroméra a Bmag0387 és a Bmag0337 markerek közt helyezkedik el. Az első négy marker található a rövid karon. A markerek közül a Bmag0387 a TL4 és a TL5 vonalban is kimutatható volt. Ez a marker polimorf az Igri és a Betzes árpafajtákban. A megfelelő allél a transzlokációs vonalakban kimutatható volt. A három disztálisan elhelyezkedő marker (Bmac0163, Bmac0303, Bmac0306) egyike sem jelent meg egyik transzlokációs vonalban sem annak ellenére, hogy az árpa szülő fajtákban határozott jelet adtak. Az 1H kromoszómán a telomérához legközelebb eső marker, az Ebmac0783 viszont mindkét transzlokációs vonalban egyértelműen kimutatható volt. Az 5H Chinese Spring /Betzes addíciós vonalban a Bmag0387 és az Ebmac0783 marker jelen volt, de a Bmac0163, a Bmac0303 és a Bmac0306

marker viszont hiányzott. Ennek alapján feltehető, hogy ezekben az árpafajtákban, vagy inkább ezeknek egy közös ősében valamikor egy kromoszóma-átrendeződés mehetett végbe, melynek következtében az 5HS karon ennek a három markernek a deléciója következett be. Ez a kromoszómatörés a szatellit régióban mehetett végbe, miután a másodlagos befűződés nem tűnt el, sőt mindkét transzlokációs vonalban (TL4, TL5) jól látható. Az 5H Chinese Spring/Betzes addíciós vonalban is jól látható még egy szatellittel rendelkező kromoszómapár. Tehát a három disztális marker eredetileg a szatellit régióban helyezkedhetett el.

A TL4 és a TL5 transzlokációs vonalakban a transzlokációs töréspont a Bmag0387 és a Bmag0337 marker közt helyezkedik el (17. ábra). A genetikai térképen a két marker közti 1cm hosszúságú szakasz a fizikai térképen az 5HS kromoszóma proximális fele.

A TL4 transzlokációs vonalban a 4D kromoszóma centroméra körüli régiója és az 5HS árpa kromoszómakar disztális szakasza alkotja a transzlokációs kromoszómát, 4D-5HS.

A TL5 transzlokációs vonalban az Igri árpafajta 5HS kromoszómakarjának az előzőhöz hasonló méretű szakasza épült át a búza 7D kromoszómájára. A transzlokációs kromoszóma ebben a vonalban 7DL.7DS-5HS.



17. ábra Az 1H (A) és az 5H (B) kromoszóma genetikai és fizikai térképén a mikroszatellit markerek elhelyezkedésének összehasonlítása. Ramsay és munkatársai (2000) genetikai térképét ábrázolja az Aa és a Ba sematikus ábra, amelyeken a markerek sorrendje és a genetikai távolságok (cm) láthatók.. Az Ab és a Bb ábrán az 1H és az 5H kromoszómán megfigyelt fizikai határjelzőket tüntettük fel. Az 1H (TL1) és az 5H (TL5) kromoszóma-szegmentumokat tartalmazó búza-árpa transzlokációs kromoszómákat GISH után az Ac és a Bc ábrán láthatjuk. A vastagbetűvel szedett markereket teszteltük a transzlokációs vonalakon. Az 1H kromoszómán a búza-árpa transzlokációs töréspont (TB) a Bmac0213 és a Bmac0032 marker között helyezkedik el. Az 5H kromoszóma rövid karján a búza-árpa transzlokációs töréspont a Bmag0387 és a Bmag0337 marker közti 1cm hosszúságú szakaszon helyezkedik el (Ba), itt található a centroméra is. Az intragenomikus transzlokációs töréspont (Tba) a másodlagos befűződéstől disztális pozícióban jött létre, felette négy marker található. Az Ebmac0783 marker a Betzes és az Igri árpafajtákban az 5HS kromoszóma terminális régiójában található. Az interspecifikus transzlokációkban (TL1, TL5) az árpa kromoszóma-szegmentumokat zölddel jelöltük, az 1H és az 5H kromoszómák lilával jelölt szakaszai nem épültek be a transzlokációkba.

14. táblázat Az öt transzlokációs vonalon vizsgált mikroszatellit markerek, amelyek kromoszómális lokalizációját eredetileg Ramsay és munkatársai határozták meg (2000). A Betzes és az Igri árpa fajta közt talált polimorfizmust is feltüntettük (p-polimorf, np-nem polimorf). Az utolsó oszlopban azoknak a transzlokációs vonalaknak a jele látható, amelyek az adott markert tartalmazzák.

Az adott marker			
Marker	kromoszómális lokalizációja a	Kontroll	Transzlokációs vonal
kapcsoltság alapján			
GMS021	1H	np	TL1
Bmac0213	1H	p	TL1
Bmac0032	1H	np	-
Bmag0211	1H	p	-
Bmag0382	1H	np	-
HVHVA1	1H	np	-
WMC1E8	1H	np	-
Bmag0579	1H	p	-
EBmac0783	1H	np	TL4, TL5
HVM36	2H	p	-
Bmag0378	2H	np	-
Bmac0093	2H	np	-
Bmag0125	2H	p	-
EBmac0415	2H	np	-
Bmag0749	2H	p	-
HvLTPPB	3H	np	TL2
Bmag0136	3H	np	TL2
Bmac0067	3H	np	TL2
Bmag0013	3H	np	-
HVM70	3H	np	-
HVM40	4H	p	TL4
Bmag0353	4H	np	TL4
Bmac0030	4H	p	TL4, TL3
Bmag0384	4H	np	TL4
HVM67	4H	np	TL4
Bmac0163	5H	np	-
Bmac0303	5H	np	-
Bmac0306	5H	np	-
Bmag0387	5H	p	TL4, TL5
Bmag0337	5H	np	-
Bmac0113	5H	p	-
Bmac0096	5H	np	-
Bmag0223	5H	p	-
HvLOX	5H	np	-
EBmac0824	5H	np	-
Bmac0316	6H	np	-
Bmag0500	6H	p	-
Bmac0018	6H	np	-
Bmag0009	6H	np	-
EBmac0806	6H	np	-
Bmac0040	6H	np	-
HVM4	7H	np	-
Bmag0369	7H	np	-
Bmag0120	7H	np	-
HvID	7H	p	-

A búza-árpa transzlokációs vonalak fertilitásai és morfológiai tulajdonságai

TL1

Ebben a vonalban egy 2DS.2DL-1HS transzlokációs kromoszómapárt azonosítottunk FISH-sel és árpa mikroszatellit markerekkel. Ezek a növények szignifikánsan alacsonyabbak, mint az Mv9 kr1 búzatörzs (15. táblázat). Martonvásáron, tenyészkertben (Tükrös), 2004 nyarán 10 vizsgált növény magassága átlagosan 45,1 cm volt, az Mv9 kr1 79,1 cm-es magasságával szemben. A kalászkok szignifikánsan rövidebbek voltak, mint az Mv9 kr1 szülőpartner kalászkai és rövid szálkával rendelkeztek. A fertilitás is elmaradt a búza szülőpartnerétől, a főkaláson kapott szemek száma fele az Mv9 kr1 főkalászához megfigyeltékének.

15. táblázat

A búza-árpa transzlokációs vonalak fertilitása és morfológiai adatai
(2004, Martonvásár, Tükrös)

Genotípus	Növény- magasság (cm)	Bokrosodás	Kalász- hossz (cm)	Kalászk/ főkalász	Fertilitás (szem/ kalászk)
TL2, 3HS.3BL	114,9**	10,5	8,1**	19,5**	2,25*
TL1, 2DS.2DL-1HS	45,1**	5,7**	7,55**	16,2**	1,41**
TL3, 6BS.6BL-4HL	101,0**	8,3	8,1**	17,7**	2,18*
TL5, 7DS.7DL-5HS	64,4**	11,6	8,85**	18,6**	2,16*
TL4, 4D-5HS+ 4H	64,7**	11,7	5,8**	16,5**	0,57**
Mv9kr1	79,1	9,4	10,6	21,8	2,59
Igri	103,8	13,7	9,7	29,9	0,81
Betzes	104,4	15,6	11,15	31,4	0,89
CS†	110,8	7,9	8	21	2,60

*, **, P>0,05 illetve>0,01 szinten szignifikánsan különböznek az Mv9 kr1 búzatörzstől

†CS = Chinese Spring

TL2

A 3HS.3HL centrikus fúziót hordozó transzlokációs vonal kalászkai jellegzetes alakúak, a kalász felső harmada tömött, kiszélesedő, az alsó harmadon a kalászkák lazábban helyezkednek el (18. ábra). A növények szignifikánsan magasabbak, mint az Mv9 kr1 szülőpartner (15. táblázat). Ennek a vonalnak a fertilitása alig maradt el az Mv9 kr1 búzatörzsétől. A növények az Mv9 kr1-hez hasonlóan bokrosodtak.

TL3

A harmadik búza-árpa transzlokációs vonal (TL3) 44 kromoszómaszámú. A 42 búza kromoszóma mellett ez a vonal még egy búza-árpa transzlokációs kromoszómapárt is

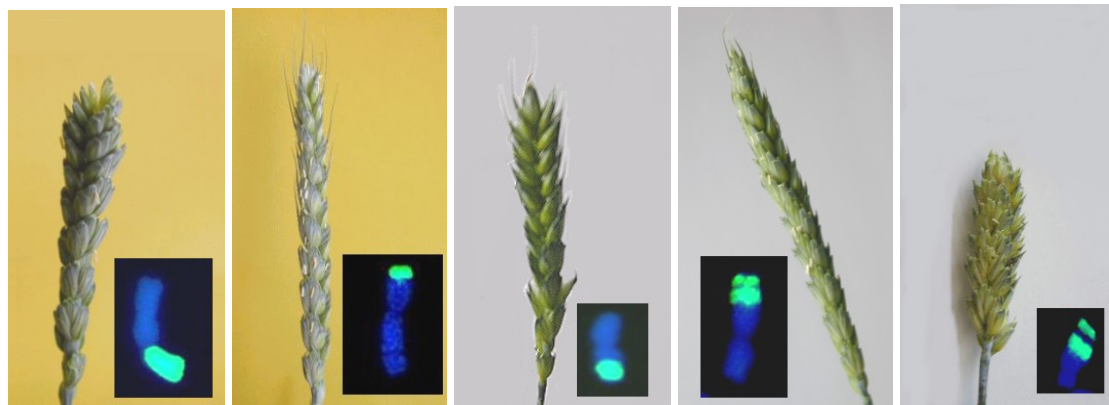
tartalmaz, amelyet 6BS.6BL-4HL-ként azonosítottunk. Ennek a vonalnak jó a fertilitása, csak kismértékben tér el az Mv9 kr1 búzatörzstől. A kalászkok viszonylag hosszúak, a kalászkák lazán helyezkednek el rajtuk, a kalász csúcsán rövid szálkák láthatók.

TL4

Ez a transzlokációs vonal szintén 44 kromoszómaszámú, a 4D-5HS transzlokációs kromoszómapár mellett még egy pár árpa kromoszómát (4H) is tartalmaz. Ennek a vonalnak a legkisebb a fertilitása, a főkalásson átlagosan 9,7 szemet kaptunk. A kalászkok rendkívül rövidek (5,8 cm), azokon a kalászkák viszonylag sűrűn ülnek. A növények szignifikánsan alacsonyabbak, mint az Mv9 kr1 búzatörzs.

TL5

A transzlokációs kromoszóma ebben a vonalban 7DS.7DL-5HS. Ennek a vonalnak egyik jellegzetessége, hogy magassága elmarad a búza szülőpartnerétől, az Mv9 kr1-től. A vonal viszonylag hosszú (8,85 cm), laza főkalással rendelkezik, amelynek jó a fertilitása (2,16 szem/kalászka).



18. ábra Búza-árpa transzlokációkat hordozó vonalak kalászhai (balról jobbra): TL2, TL3, TL1, TL5, TL4. A kalászkok mellett a képek jobb alsó sarkában a különböző vonalakban kimutatott transzlokációs kromoszómák láthatók GISH után. Az árpa kromoszóma-szegmentum sárgászöld, a búza kromoszóma kék.

4.2. Búza × rozs hibridek, amfidiploidok, rekombinánsok előállítása

4.2.1. Búza × rozs hibridek, amfidiploidok létrehozása

Az Mv9 kr1 búzatörzs és a Lovászpatonai rozs fajta keresztezésekor átlagosan 68,4%-os szemkötést kaptunk (16. táblázat), amely Lein (1943) osztályozásának megfelelően a *kr1kr1kr2kr2* homozigóta recesszív génkonfigurációnak felel meg.

16. táblázat

Az Mv9 kr1 búzatörzs szemkötése a Lovászpatonai rozs fajtával történő keresztezéskor (Martonvásár, üvegház, 1994)

Mv9 kr1 A növény sorszáma	Megporzott virágok száma	Szem/kalász	Szemkötés %
1	28	18	64,2
2	30	28	93,3
3	30	2	6,6
4	34	29	85,3
5	34	26	76,5
6	34	26	76,5
7	32	23	71,8
Összes	222	152	
Átlag	31,7	21,7	68,4
St. hiba			10,7

Az F₁ nemzedékben 19 növényt kolchicinnel kezeltünk, amelyeken önmegporzással összesen 38, növényenként átlagosan két szemet kaptunk (17. táblázat). Ezekből a szemekből 21 F₂ (C₁) növényt neveltünk fel. Az Mv9 kr1 búzatörzsszel megporzott 18 növényen összesen 80 BC₁ szemet kaptunk, azaz a szemkötés átlagosan 8,5% volt (St. Hiba 2,06). Az első visszakeresztezés során tehát a szemkötés lényegesen kisebb lett, mint a hibrid előállításakor. Az öntermékenyült kalászon összesen 861 F₃ (C₂) szem fejlődött, az átlagos szemszám 41 lett (17. táblázat). A fertilitás a C₁ nemzedékben jelentősen megnőtt az első kolchicinkezelt (C₀) generációhoz képest. A kapott F₃ utódok közül 55-nek vizsgáltuk a kromoszómaszámát mitózisban Feulgen módszerrel (18. táblázat). A vizsgált szemek közel feléből (47,3%) készült kromoszóma-preparátumokban a vártak megfelelően 56 kromoszómát számoltunk, de az utódok több mint felében megkezdődött a kromoszómaszám redukálódása.

17. táblázat

A kolchicinnel kezelt Mv9kr1 × Lovászipatonai hibridek (C₀), oktoploid tritikálé (C₁) fertilitása (Martonvásár, üvegház, 1995-96)

Generáció	Öntermékenyült növények száma	Öntermékenyült kalászkok száma	Összes szemszám	Szem/növény	St. hiba
C ₀	19	40	38	2	1,00
C ₁	21	40	861	41	6,55

18. táblázat

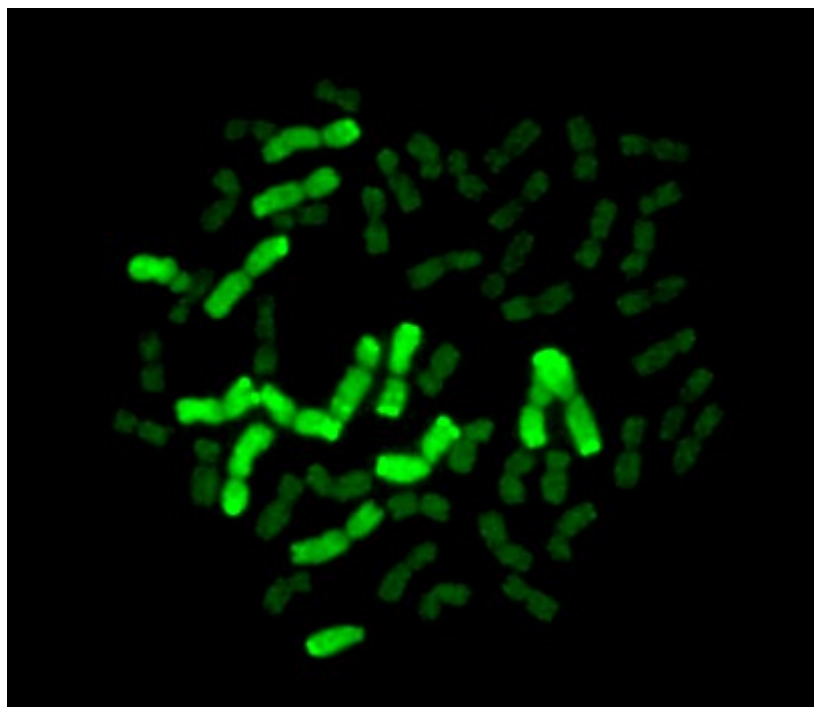
Az Mv9 kr1 × Lovászipatonai oktoploid tritikálé F₃ (C₂) nemzedékének kromoszómaszáma mitózisban

Generáció	Vizsgált növények száma	56	55	54	53	52	51
		kromoszómaszámú növények száma					
C ₂	55	26	9	15	0	4	1

19. ábra Az Mv9kr1 × Lovászipatonai amfidiploid (C₁) kalásza

4.2.2. Rozs kromoszómák kimutatása GISH-sel

Az Mv9 kr1 × Lovászpatonai amfidiploidokban GISH-sel mutattuk ki a rozs kromoszómákat (20. ábra). A teljes genomi rozs DNS-t használva próbaként mind a 14 rozs kromoszóma kimutatható volt az amfidiploidokban. A fluorogreennel végzett jelölés eredményeként a rozs kromoszómák sárgászölden jelölődtek, a búza kromoszómák a DAPI festés eredményeként kék lettek. A rozs kromoszómák végén a C-sávozáshoz hasonlóan élénkebb jelölődés tapasztalható, ami azzal magyarázható, hogy a repetitív szekvenciák elsősorban a heterokromatikus régióban helyezkednek el, így ehhez a szakaszhoz több DNS kötődik.



20. ábra Az Mv9 kr1 × Lovászpatonai amfidiploidokban a rozs kromoszómák kimutatása genomikus *in situ* hibridizációval. Teljes genomi rozs DNS-t jelöltünk Fluorogreennel, amelynek következtében a rozs kromoszómák élénk sárgászölden jelölődtek, a búza kromoszómák jelöletlenek, halványzöldek. A képen 14 rozs kromoszóma látható. Egy rozs kromoszóma telocentrikus, a kromoszóma egyik karja hiányzik.

4.2.3. Búza/rozs rekombinánsok előállítása

Az Mv9 kr1 × Lovászpatonai oktoploid tritikálét megporoztuk az 1BL.1RS transzlokációt hordozó Matador búzafajtaival. A kísérlet célja rekombináció létrehozása volt az 1RS kromoszómakarban az eredeti Petkus német rozs fajta és a Lovászpatonai magyar rozs fajta kromoszómakarja közt. A Matador búzafajtaival huszonöt oktoploid tritikálé növényt poroztunk meg. Ebből a keresztezésből összesen 97 szemet kaptunk, a szemkötés 11,2% volt. Az F₁ növények genomösszetétele AABB²⁻⁷1B/1RDDR lett.

Összesen 79 pollenanyasejtben vizsgáltuk az 1B.1R kromoszóma párosodását a többi búza illetve rozs kromoszómával.

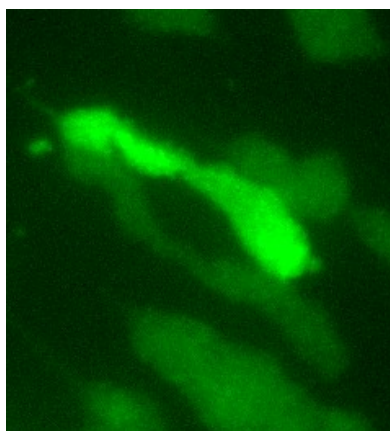
19. táblázat

Az Mv9 kr1 × Lovászpatonai oktoploid tritikálé és az 1B/1R transzlokációt hordozó Matador búzafajta keresztezéséből előállított F₁ hibrid meiózisének I metafázisában megfigyelt kromoszóma-konfigurációk. A rozs kromoszómák kimutatása meiózisban GISH-sel történt, ahol teljes genomi rozs DNS-t alkalmaztunk próbaként.

Konfiguráció	Univalens	Nyílt bivalens		Trivalens	Quadrivalens	Összes
		Búza-	1B/1R-	Búza-	Búza-búza-	
	1B/1R	1B/1R	1R	1B/1R-1R	1B/1R-1R	
Sejtek száma	4	49	4	218	1	79
Gyakoriság %	5,0	62,0	5,0	26,6	1,2	100

A rozs kromoszómákat a búzától meiózisban GISH-sel a fluoreszcens jelölődés alapján jól meg tudtuk különböztetni (21. ábra). Az 1B/1R transzlokációs kromoszóma és a búza kromoszómák közt létrejött bivalensekben, trivalensekben feltételeztük, hogy elsősorban az 1B kromoszóma párosodik a transzlokációban az 1B hosszú karjával, de miután lehetséges más búza kromoszómával való párosodás is, ezért a táblázatban csak búza kromoszómát jelöltünk meg. A rozs homeológ kromoszómák közti párosodás esélye minimális, így feltételeztük, hogy a rozssal való párosodás az 1R kromoszómával történt.

A megfigyelt sejtek 32,8%-ában jött létre párosodás a Matador búzafajta 1B/1R transzlokációs kromoszómája és a Lovászpatonai rozs 1R kromoszómája közt. Tehát várható, hogy a sejtek egy harmadában rekombináció jöhet létre a Lovászpatonai és a Petkus rozs közt.



21. ábra Az Mv9 kr1 \times Lovászipatonai oktaploid tritikálé és az 1B/1R transzlokációt hordozó Matador búzafajta keresztezéséből előállított F₁ hibrid meiózisének I. metafázisában megfigyelt trivalens. A rozs kromoszómák kimutatása GISH-sel történt, ahol teljes genomi rozs DNS-t alkalmaztunk próbaként. A rozs kromoszóma(kar) a képen élénk sárgászöld, a búza kromoszóma(kar) halványzöld. A képen látható trivalens egy búza, egy 1B/1R transzlokáció és egy rozs kromoszóma közt jött létre.

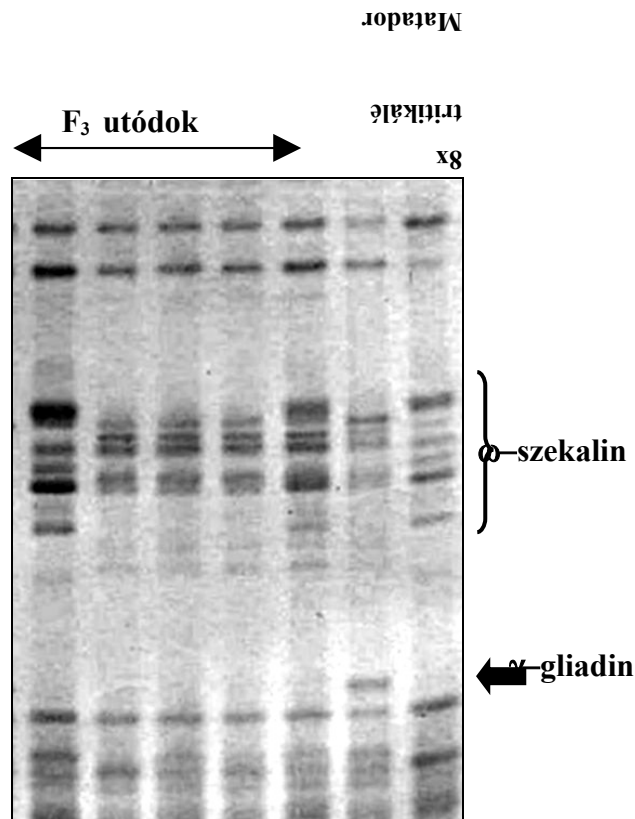
Búza-rozs rekombinánsok kimutatása

Az Mv9 kr1 \times Lovászipatonai amfiploidok egyes vonalainak szekalin mintázata lényegesen eltért a Petkus rozst tartalmazó 1BL.1RS transzlokációt hordozó fajtákétól, így a szekalin mintázat alkalmasnak bizonyult a továbbiakban a Lovászipatonai rozs jelenlétének követésére.

Összesen 254 növény szekalin vizsgálatát végeztük el azzal a céllal, hogy az [(Mv9kr1 \times Lovászipatonai) \times Matador] \otimes^2 BC₁F₃ nemzedékben fellépett-e a *Sec-1* tartalékfehérje gént érintő rekombináció a Lovászipatonai rozs 1RS és a Matadorban meglévő Petkus rozs 1RS kromoszómakarja közt. Összesen 26 rekombináns genotípust válogattunk ki a szekalin mintázat alapján (22. ábra).

A Lovászipatonai rozs kromatint tartalmazó 1BL.1RS rekombinánsok egy részét fitotronban, egy részét pedig tenyészkertben elszaporítottuk. Korábban két növényben mutattunk ki rekombinációt a Lovászipatonai és a Petkus rozs kromoszómakar között, az Mv9

kr1 × Lovászpatonai oktoploid tritikálé Matador búzafajtaival megporzott, majd öntermékenyített utódai közt. A rekombinánsok szekalin mintázata a Lovászpatonai rozsra hasonlított és eltért a Petkus rozst hordozó 1BL.1RS transzlokációt hordozó fajtákétól. A két rekombináns növényt fitotronban neveltük fel, az egyikben 194, a másikban 198 szemet kaptunk, amelyekből 20-20 szemet csíráztattunk, majd fitotronban felneveltük. Az első rekombinánsról származó 20 növényen összesen 1278, a másik rekombináns növényről származó 20 növényen összesen 751 szemet kaptunk. Miután a két növényről már elegendő számú szem állt rendelkezésünkre, az utódokat 2004 őszén tenyészkertben elvetettük. Mindkét rekombinánsról 10-10 sort vetettünk (az 1 m hosszú sorba 10-10 szemet vetve) és azokon 2005 nyarán megfigyeléseket végeztünk. A 2005-ös évben tenyészkertünkben általában nagyon erős levélrozsa fertőzés volt tapasztalható, többek közt azért, mert az itt szaporított Mv9 kr1 búzatörzs a levélrozsdára nagyon fogékony. Sajnos a rekombinánsokon is tapasztaltunk levélrozsdát, tehát megállapíthatjuk, hogy ezekbe a rekombináns növényekbe nem épültek be új hatékony levélrozsa rezisztencia gének. A szülőpartner Lovászpatonai rozsfaftán viszont csak nagyon kis mértékben fordult elő levélrozsa fertőzés a tenyészkertben. Az 1RS kromoszómakaron a NOR régió felett helyezkedik el a szekalin gén, majd felette a disztális régióban található a rezisztenciagének (*Lr26*, *Sr31*, *Yr9*, *Pm8*). A szekalinra nézve rekombináns egyedeken feltehető a rezisztenciagének rekombinációja is. Ebben az esetben valószínű, hogy a Lovászpatonai rozsából beépült szakaszon nem található új hatékony rezisztencia gének a levélrozsdával szemben. A továbbiakban vizsgálni kívánjuk ezeknek a rekombinánsoknak a minőségét is. Elképzelhető, hogy az új rekombinánsokban a Lovászpatonai rozs szekalin tartalma kevésbé befolyásolja majd a búza minőségét. A minőség vizsgálatokhoz megfelelő mennyiségű minta szükséges, ezért a 2004 őszén 20 sorban elvetett összesen 200 növény szemtermését 2005-ben learattuk, majd feldolgoztuk. Miután a levélrozsa fertőzöttség tekintetében az egyes sorok közt különbségeket tapasztaltunk, így a kevésbé fertőzött sorokról származó szemek közül 290 szemet, 29 sorba (10 szem/1 m sor) 2005 őszén tenyészkertben elvetettünk. 2006-ban ismét vizsgálni kívánjuk a rekombinánsok levélrozsa fertőzöttségét.



22. ábra Az Mv9 kr1 × Lovászipatonai amfidiploid (8x tritikálé), a Petkus rozs 1RS kromoszómakarját hordozó Matador búzafajta, és az [(Mv9kr1 × Lovászipatonai) × Matador] \otimes^2 BC₁F₃ szemek szekalin mintázata. A Matador és a Mv9 kr1 × Lovászipatonai amfidiploid szekalin mintázata jól láthatóan eltér egymástól. Egyes F₃ utódok a Petkus (1., 5. oszlop), mások a Lovászipatonai mintázathoz (2., 3., 4.) hasonlítanak.

A későbbiek során az Mv9 kr1 × Lovászipatonai oktoploid tritikálé Matador búzafajtával megporzott, majd öntermékenyített utódai közül még 24 db rekombináns szemet válogattunk ki a szekalin mintázat alapján. Ezekből a szemekből az endospermium egyik felét használtuk fel tartalékfehérje elektroforézishez a rekombinációk kimutatására. A maradék fél szemeket csíráztattuk, amelyek közül 13-ból tudtunk növényeket felnevelni, a többi vagy nem csírázott, vagy a fejlődő növényke elpusztult. A felnevelt 13 növényből 3 steril lett, így a maradék tíz rekombináns növényen összesen 418 szemet kaptunk. A 418 szemből összesen 135-öt 2005 őszén tenyészkertben elvetettünk (23. ábra). A 135 szem összesen 7 különböző rekombináns növényről származott, miután három rekombináns növényen alig kaptunk szemet (12, 19, 8 szem). Amelyik növényről csak nagyon kevés szemmel rendelkezünk, azokat ismét fitotronban kívánjuk szaporítani. A rekombináns növényeken kapott utódok betegségrezisztenciájának vizsgálata 2006 nyarán várható. A 135

növényen feltehetően elő tudunk állítani majd olyan mennyiségű utódszemet, amelyeken a későbbiekben minőségvizsgálatok is elvégezhetők.



23. ábra Az (Mv9 kr1 × Lovászipatonai) × Matador keresztezésből előállított 1RS kromoszómakarban a Petkus rozs és a Lovászipatonai rozs közt rekombináns növény kalásza a szülőpartnerek mellett. Balról jobbra: Mv9 kr1, Lovászipatonai rozs, Matador búzafajta, rekombináns növény.

4.3. Búza × *Aegilops biuncialis* hibridek, addíciók

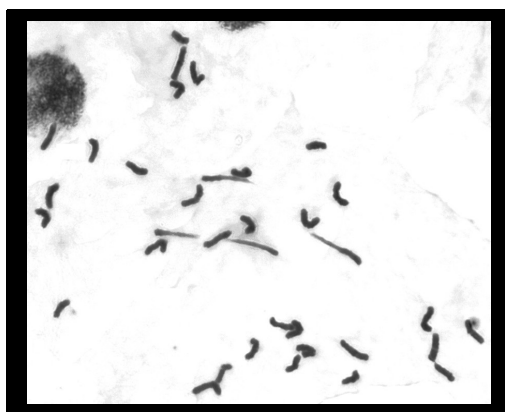
4.3.1. Búza × *Aegilops biuncialis* hibridek, amfidiploidok előállítása

Az Mv9 kr1 búzatörzset az MvGB642 jelű *Aegilops biuncialis* vonallal 1995 nyarán tenyészkertben megporoztuk. Összesen 575 virágot poroztunk meg, amelyeken 215 szemet kaptunk, tehát a szemkötés 37,4% volt. Az F₁ hibridek közül 55-nek ellenőriztük a kromoszómaszámát mitózisban, amely a vártnak megfelelően 35 lett (ABDUM). Az F₁ hibridekben a kromoszómák párosodását 105 sejtben ellenőriztük (20. táblázat).

20. táblázat

Az Mv9 kr1 × *Aegilops biuncialis* F₁ hibridek meiózisének I. metafázisában megfigyelt kromoszóma-konfigurációk. A sejtenkénti szélsőértékek az átlag alatt zárójelben találhatóak

Vizsgált sejtek száma	A kromoszómák száma	Meiotikus konfigurációk					Sejtenkénti kiazmák száma
		Univalens	Bivalens			Trivalens	
			Nyílt	Zárt	Összes		
105	35	33,14	0,81	0,09	0,91	0,009	1,02
		(27-35)	(0-5)	(0-2)	(0-5)	(0-1)	(0-5)



24. ábra Az Mv9 kr1 × *Aegilops biuncialis* F₁ hibrid meiózisének I. metafázisa. A kromoszóma-preparátumot Feulgen módszerrel festettük. Két szétváló nyílt bivalens és 31 univalens.

Az F₁ hibridekben a kromoszómák többsége nem párosodott egymással, univalenseket alkottak (33,14 univalens/sejt) (24. ábra). A megfigyelt bivalensek száma (0,91/sejt) akár a homeológ búza kromoszómák párosodásából is fakadhat. Így megállapíthatjuk, hogy a búza ABD és az *Ae. biuncialis* U és M kromoszómái alapvetően nem párosodnak egymással, ami megnehezíti a későbbiekben a génátvitelt ebből a fajból a búzába.



25. ábra Mv9 kr1 × *Aegilops biuncialis* F₁ hibrid kalásza

Az F₁ hibridek morfológiailag átmeneti jellegűek voltak a búza és az *Ae. biuncialis* szülőpartner közt (25. ábra), jól bokrosodtak, a kalászok érés előtt antociános elszíneződést mutattak. A levelek szőrözöttsége, a pelyvalevelek keménysége az *Aegilops* szülőre utalt. Az F₁ hibrid kalásza teljes hímsterilitást mutattak.

Az F₁ hibridek közül 25 növényt kolhicinnel kezeltünk a kromoszómaszám megduplázásának céljával. A kalászok egy részét izoláltuk, hogy öntermékenyülés következhesen be, más kalászokat búzával megporoztunk. Önmegporzásból összesen 17 szemet kaptunk, ezekben a kromoszómaszám 70 lett, tehát megkettőződött (26. ábra). A 417 búzával megporzott virágból 10 db BC₁ szem fejlődött. A kapott szemekből nyolc az Mv25 búzafajtával való megporzásból fejlődött, ezeket az utódokat használtuk fel a további génátviteli munkában.





26. ábra A kolchicinnel kezelt Mv9 kr1 \times *Aegilops biuncialis* amfidiploid szomatikus kromoszómái mitózisban ($2n = 10 \times = 70$, AABBDDUUMM).

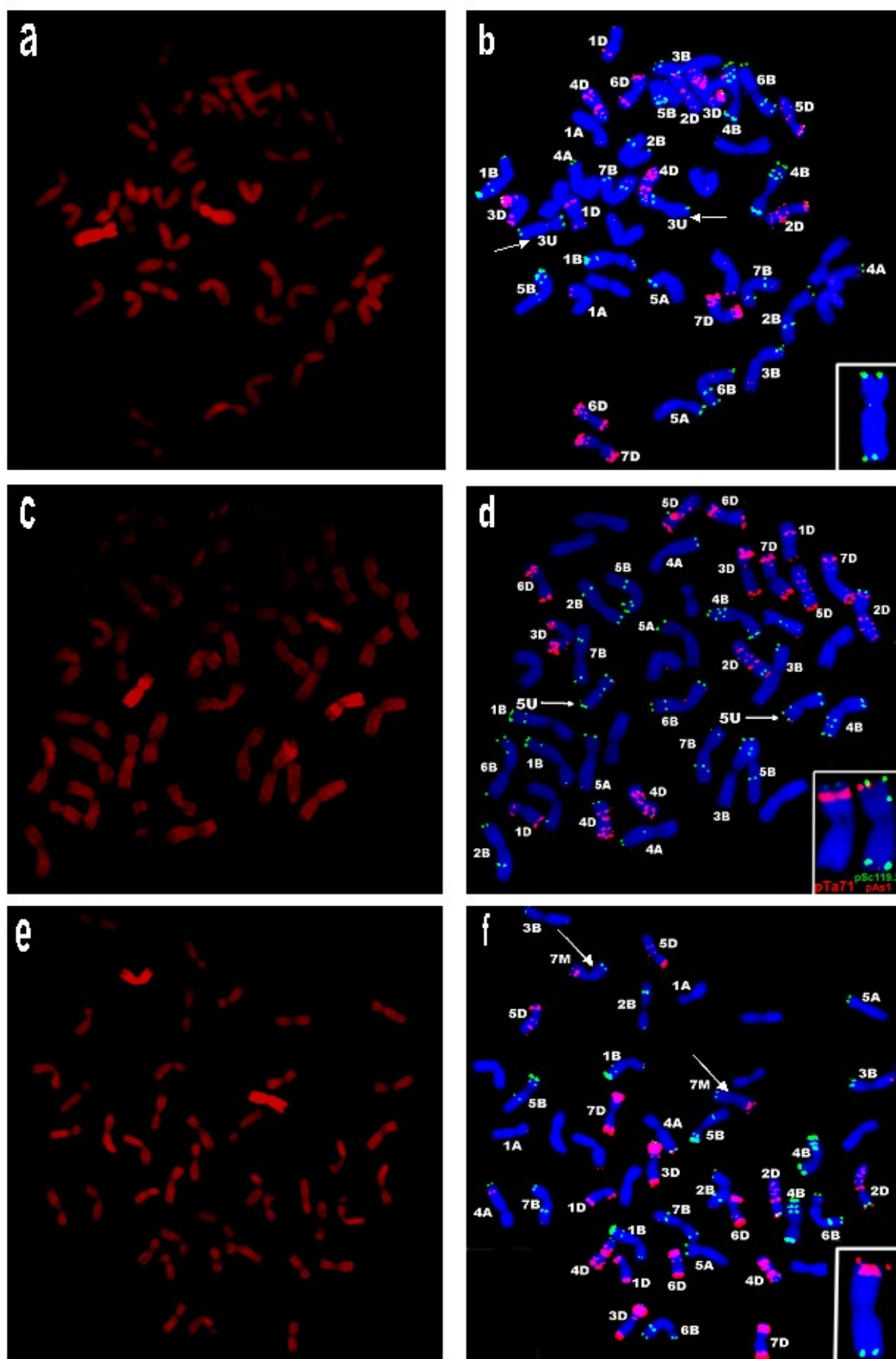
A Mv9 kr1 \times *Aegilops biuncialis* hibridek búzával visszakeresztezett utódait az Mv9 kr1 búzatörzsszel ismételtten visszakereszteltük, így BC₂, majd BC₃ utódokat hoztunk létre, amelyek már fertilisek lettek. Ezeknek a növényeknek öntermékenyített utódai közül Feulgen módszerrel 43 kromoszómaszámú monoszómás addíciókat válogattunk ki. A monoszómás addíciók öntermékenyített utódai közül kiválogattuk a 44 kromoszómaszámú egyedeket. Meiózisban ellenőriztük a kromoszómák párosodását, és a 22 bivalens konfigurációt mutató növényekről feltételeztük, hogy azok diszómás addíciók. A következő feladat volt az egyes addíciós vonalakban az *Aegilops biuncialis* kromoszómák azonosítása.

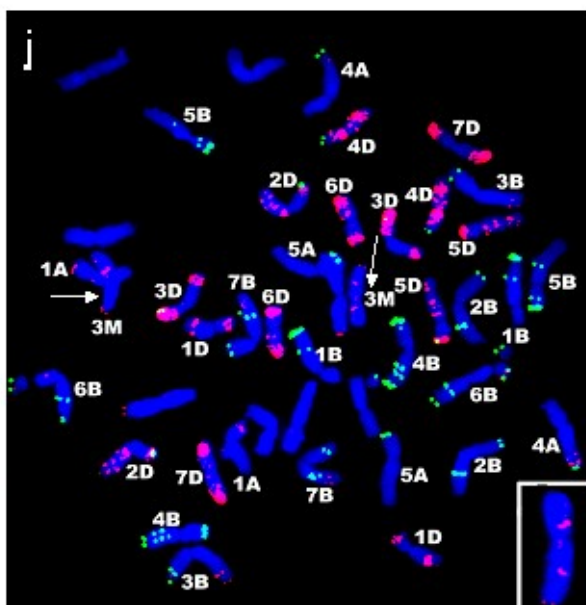
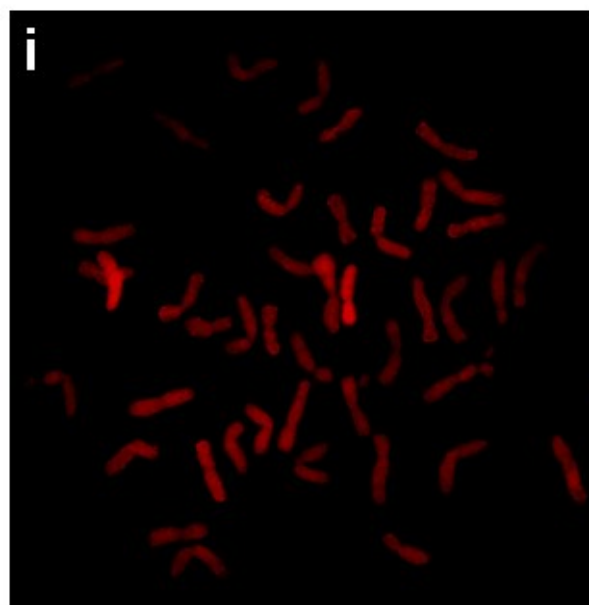
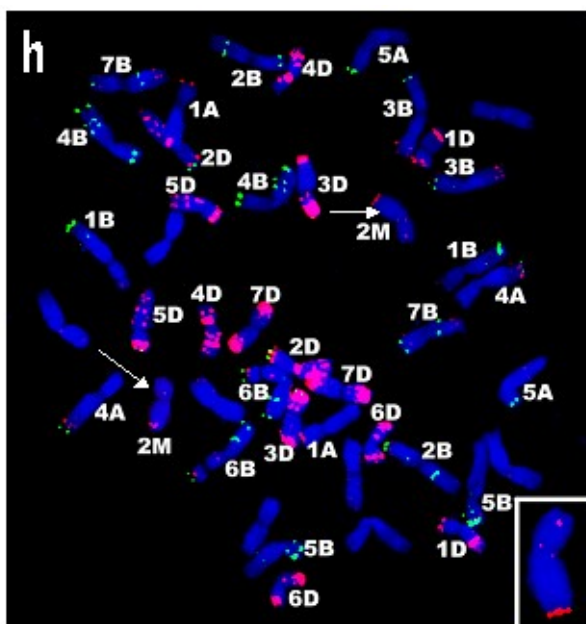
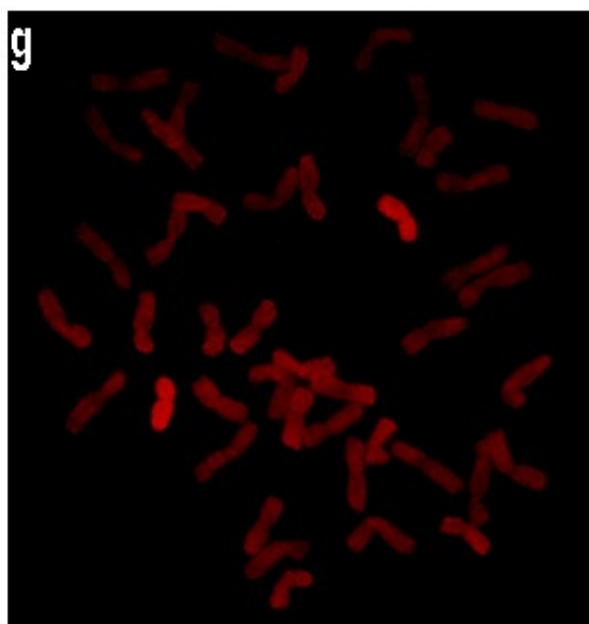
4.3.2. Búza/*Aegilops biuncialis* addíciós vonalak azonosítása FISH-sel

A búza és az *Aegilops biuncialis* kromoszómák azonosítására a pSc119.2 és a pAs1 DNS próbát használtuk fel. Búza kromoszómák azonosítására ezt a két próbát már korábban is sikeresen alkalmaztuk laboratóriumunkban (Molnár-Láng és mtsai, 2002). Az egyes *Aegilops biuncialis* kromoszómák meghatározásának érdekében részletesen elemeztük a diploid ősök FISH hibridizációs mintázatát és az egyes fajokon belül előforduló polimorfizmust. Összesen négy *Ae. umbellulata*, négy *Ae. comosa* és három *Ae. biuncialis*

vonali FISH hibridizációs mintázatát elemeztük, amelynek alapján kidolgoztuk az egyes U és M kromoszómák idiogramját (Schneider és mtsai, 2005).

Összesen hat különböző, 44 kromoszómaszámú diszómás búza/*Aegilops biuncialis* addíciós vonalat állítottunk elő. Az első vonalban (jele: 76.010130.) a MvGB642 számú *Ae. biuncialis* szülőpartner FISH mintázata alapján a 3U kromoszóma jelenlétét mutattuk ki (27.a,b ábra). A 3U kromoszómára jellemző, hogy mindkét kar végén erős pSc119.2 FISH jel látható. Kararányai alapján a 2U kromoszómától megkülönböztethető, szubmetacentrikus kromoszóma. A második vonalban (jele: 629.020905.) egy szatellit *Aegilops* kromoszóma volt jelen, amelyet 5U-ként azonosítottunk (27.c,d ábra). A szatelliten egy erős pSc119.2 jel, a NOR régió alatt pedig egy pAs1 jel látható. A szatellit jelenlétét a pTa71 DNS próbával is megerősítettük. A harmadik vonalban (jele: 80.010130.) a 2M kromoszómapár volt látható a búza kromoszómák mellett (27.g,h ábra). A 2M kromoszóma rövid karján egy terminális, hosszú karján két szubterminális pAs1 jel látható. A negyedik vonalban (jele: 77.001102.) a 3M kromoszómát tudtuk azonosítani, amely hasonlít a 2M-re, de annál kevésbé szubmetacentrikus. Az ötödik vonalban (jele: 63.010130.) a 7M kromoszómapárt azonosítottuk. A 7M kromoszóma rövid karján két szubterminális, hosszú karján egy szubterminális pAs1 jel látható, amelyek mellett a hosszú karon pSc119.2 szubterminális jel is van (27.e,f ábra). Az *Ae. biuncialis*-ban előforduló két metacentrikus kromoszóma egyike a 7M, a másik a 4U, de annak mintázata ettől jelentősen eltér.





27. ábra Különböző búza/*Aegilops biuncialis* diszómás addíciós vonalak szomatikus kromoszómái mitózisban genomikus *in situ* hibridizáció (GISH) és fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) után. A GISH képeken (a, c, e, g, i) az *Ae. biuncialis* kromoszómák vörösen jelölődtek, a búza kromoszómák jelöletlenek, halvány vörösek. A FISH képeken (b, d, f, h, j) a pSc119.2 jelek sárgászöldek, a pAs1 jelek vörösek, a kontrasztfestést DAPI-val végeztük, így a kromoszómák jelöletlen szakaszai kékek. A FISH képek alsó jobb sarkában az *Ae. biuncialis* kromoszómát kinagyítottuk.

a, b, A 3U addíciós vonal GISH (a) és FISH (b) mintázata. c,d, Az 5U addíciós vonal GISH (c) és FISH (d) mintázata. A kép alsó jobb sarkában az 5U kromoszóma pTa71 (vörös), majd pSc119.2 és pAs1 mintázata. e,f, A 7M addíciós vonal GISH (e) és FISH (f) mintázata. g,h, A 2M addíciós vonal GISH (g) és FISH (h) mintázata. i,j, A 3M addíciós vonal GISH (i) és FISH (j) mintázata. k, A búza/*Ae. biuncialis* addíciós vonalak és a szülőpartnerek kalásza. Balról jobbra: *Ae. biuncialis*, Mv9 kr1, 2M, 3M, 7M, 3U, 5U addíciós vonalak.

A hatodik vonalban az addicionált *Aegilops* kromoszómát nem tudtuk azonosítani, miután azon nem kaptunk jellegzetes FISH mintázatot. A teljes *Ae. comosa* DNS-sel végzett GISH azonban kimutatta, hogy ebben a vonalban egy pár M genomhoz tartozó kromoszómapár van jelen.

4.3.3. Búza/*Aegilops biuncialis* addíciós vonalak morfológiai jellemzői

A kiválogatott búza/*Aegilops biuncialis* addíciós vonalakat kezdetben fitotronban, kontrollált körülmények között neveltük fel, majd tenyészkertben szaporítottuk.

A 3U addíciós vonalak szignifikánsan alacsonyabbak, mint a búza szülőpartner (Mv9 kr1). A kalászok laza szerkezetűek, a búza szülőnél rövidebbek (27.k ábra). Fertilitásuk elmaradt nemcsak a búza szülőpartnerétől, de a 2M, 3M addíciós vonalétól is. A növények szára gyengébb, mint a többi addíciós vonalé, a levelek sárgászöldek. 2004-ben tenyészkertben ezen a vonalon lisztharidot nem figyeltünk meg, de *Helminthosporium* foltok előfordultak.

Az 5U addíciós vonal kalásza tar, felső harmada tömöttebb és érés előtt erősen antociános elszíneződést mutat az *Ae. biuncialis* szülőpartnerhez hasonlóan. A növények alacsonyabbak, mint a búza szülőpartner. Ennek a vonalnak a legkisebb a fertilitása.

A 2M addíciós vonal kalásza tömött, szálkacsökevényekkel rendelkezik. Ezeknek a növényeknek a legszélesebbek a levelei. A főkalásonkénti szemszám ezen a vonalon a legnagyobb, fertilitása csak kismértékben marad el a búzától. Szára hamvaszöld színű. Tenyészkertben 2004-ben lisztharmattal és *Helminthosporium*-mal kismértékben fertőződött.

A 3M addíciós vonal kalásza jellegzetes formájú: tömött, közepén jelentősen kiszélesedő, felfele elkeskenyedő. A kaláson szálkacsökevények láthatók. A kaláscsók alatt csökevényes, másodlagos kaláscsók láthatók. A 2M után a másik legfertilisebb addíció. A növények lisztharmattal és *Helminthosporium*-mal is fertőződtek, a betegségekkel szemben a legfogékonyabbnak tűntek.

A 7M addíciós vonal hosszú, laza kaláscsókcal rendelkezik, amelynek a csúcsi részén rövid szálkacsók láthatók. A növények hamvaszöldek. Tenyészkertben 2004-ben az összes addíciós vonal közt a legegészségesebbek voltak, se lisztharmat, sem *Helminthosporium* nem volt rajtuk.

Az összes vonal 2004-ben és 2005-ben is Martonvásáron tenyészkertben levélrozsdával fertőződött, ezért az *Ae. biuncialis* levélrozsdá rezisztenciája feltehetően nem a 3U, 5U, 2M, 3M és 7M kromoszómákon lokalizált.

Az addíciós vonalakat tenyészkertben felszaporítottuk, így mindegyik vonalból több ezer szem a rendelkezésünkre áll a további abiotikus és biotikus stressz vizsgálatokhoz.

21. táblázat

A Triticum aestivum/Ae. biuncialis addíciós vonalak és az Mv9 kr1 búzatörzs fertilitása és morfológiai tulajdonságai (2004, Fitotron, 10-10 növény átlaga)

Genotípus	Fertilitás (szem/ kalászká) (db)	Növény- magasság (cm)	Bokrosodás (kalász/ növény) (db)	Főkalász hossza (cm)	Szem/ főkalász (db)
Mv9kr1	2,749	60,6	6,3	9,4	53,1
2M	2,788	36,7* *	4,2* *	8,6	55,5
3M	2,411*	32,8* *	5,3	8,4	46,7
7M	2,045* *	46,9* *	5,1	10,6* *	34,1* *
+3U	2,164* *	48,7* *	5,9	8,7	40,8* *
5U	0,983* *	40,4* *	5,5	8,3	16,8* *

*, ** Szignifikánsan különbözik az Mv9kr1 búzatörzstől P<0,05 és P<0,01 szignifikancia szinteken

22. táblázat

A Triticum aestivum/Ae. biuncialis addíciós vonalak és a szülőpartnerek fertilitása és morfológiai tulajdonságai (2004, Martonvásár, tenyészkert, 10-10 növény átlaga)

Genotípus	Fertilitás (szem/ kalászká) (db)	Növény- magasság (cm)	Bokrosodás (kalász/növény) (db)	Főkalász hossza (cm)	Szem/ főkalász (db)
Mv9kr1	2,517	79,1	9,4	9,9	56,5
<i>Ae.</i>	1,983	39,5	77,3	3,7	7,0
2M	2,237*	65,6* *	7,9	9,3	52,3
3M	2,285*	61,2* *	10,1	8,4* *	46,5* *
7M	1,749* *	65,5* *	9,8	8,8* *	25,9* *
3U	1,920* *	70,0* *	11,1	8,7* *	33,3* *

*, ** Szignifikánsan különbözik az Mv9kr1 búzatörzstől P<0,05 és P<0,01 szignifikancia szinteken

5. MEGVITATÁS

5.1. Búza × árpa hibridizáció

Keresztezhetőség

Új őszi búza × őszi árpa hibrideket állítottunk elő három különböző termesztett őszi árpa fajtával (Igri, Manasz, Osznova). Az Igri egy kétsoros őszi német árpafajta, a Manasz és az Osznova pedig hatsoros őszi ukrán árpafajták, amelyek sokkal kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a korábbi keresztezésekben felhasznált genetikai modell Betzes kétsoros tavaszi árpafajta. Az új kombinációk előállítása ezért agronómiai szempontból előnyösebb származékok létrehozását teszi lehetővé. Az ukrán árpafajták a Közép-európai éghajlati viszonyoknak megfelelő adaptálódó képességekkel rendelkeznek. Ezekben a kombinációkban azonban a szemkötés lényegesen kisebb volt, mint a Chinese Spring búza és a Betzes árpafajták keresztezésekor (Islam és mtsai, 1978; Fedak, 1980; Molnár-Láng és Sutka, 1994). A búza és árpafajták keresztezhetőségét mindkét fajban keresztezhetőségi gének (Fedak és Jui, 1982; Taketa és mtsai, 1995, 1998) határozzák meg, melynek következtében az általunk használt fajták keresztezhetősége elmaradt a Chinese Spring és a Betzes tavaszi fajtákétól. Kísérleteinkben 13 árpafajta a búzával keresztezhetetlennek bizonyult. Ennek elsősorban genetikai okai lehetnek, de nem kizárt, ha több virágot poroztunk volna meg, vagy ha a külső körülmények kedvezőbbek lettek volna, akkor elérhettünk volna szemkötést. A megporzásokat fitotronban, levágott kalászon végeztük, amely esetleg tovább csökkentette a termékenyülés esélyét. A módszer alkalmazására azért volt szükség, hogy minél több kalászt porozhassunk meg kontrollált körülmények közt anélkül, hogy a növényeket a fitotronban neveljük fel, amely nagyon költséges lett volna. A hibridek nagyfokú hím és nősterilitást mutattak, amelynek következtében más szerzőkhöz hasonlóan (Wojciechowska és Pudelska, 1993, Jauhar, 1995) nem sikerült a kiindulási hibrideken búzával való megporzáskor szemkötést elérnünk.

Szövettenyésztés hatása a hibridekre, meiózis

A hibrideket szövettenyésztésben szaporítottuk el, így a további megporzásokhoz nagy számban állítottunk elő növényeket. A regeneráns növényeken búzával végzett megporzásokból utódokat állítottunk elő, amelyekből a továbbiakban addíciós vonalakat

hoztunk létre. Korábban is megfigyelték már, hogy a fajhibridek szövettényészetben való elszaporítása után a fertilitás részleges helyreállása fordulhat elő (Bai és Knott, 1993; Pershina és mtsai, 1988). Sharma és munkatársai (1984), majd Fedak és Grainger (1986) is beszámoltak arról, hogy olyan intergenerikus hibrideket is vissza tudtak keresztezni az *in vitro* szaporítás után, amelyek korábban teljes hím és nősterilitást mutattak. A kiindulási hibridhez képest a fertilitás jelentős javulását figyeltük meg már korábbi kísérleteinkben is néhány árpa × búza regeneráns növényen (Molnár-Láng és mtsai, 1991). Részletesen tanulmányoztuk a regenerált hibridek kromoszóma-párosodását a meiózis I. metafázisában, és ennek alapján a fertilitás megváltozásai bizonyos mértékig magyarázhatók.

Az Mv9 kr1 × Igri és az Asakaze komugi × Manasz hibridekben a sejtenkénti kromoszóma asszociációk száma (1,59) nem sokkal haladta meg a korábban a Chinese Spring × Betzes hibridekben megfigyelt értékeket (Fedak, 1980 – 1,48; Molnár-Láng és Sutka, 1994 - 1,28), de sokkal kisebb lett, mint amennyit Jauhar (1995) a Fukuho komugi × Luther hibridben megfigyelt (5,08-6,72). A bivalensek száma több lett, mint amennyiről búza × rozs hibridekben korábban beszámoltak (Miller és Riley, 1972; Mettin és mtsai, 1976; Miller és mtsai 1994). Nem ismert még, hogy a két nemzetséghibrid párosodási gyakorisága közt megfigyelt különbség mivel magyarázható. Lehetséges, hogy az árpa kromoszómák jelenlétében a búza homeológ kromoszómák közt a párosodás nagyobb, mint a rozs jelenlétében, vagy a másik lehetőség, hogy a búza és az árpa kromoszómák közti párosodás gyakoribb, mint a búza és a rozs kromoszómák közt. Az árpa és a búza közt a genetikai távolság nagyobb, mint a búza és a rozs közt, így ennek alapján várható volt, hogy a két nemzetség kromoszómái közt a párosodási gyakoriság kisebb lesz.

A búza és az árpa kromoszómák párosodásának vizsgálatára GISH-t alkalmaztunk, a búza és a rozs kromoszómák közti asszociációk tanulmányozásához hasonlóan (King és mtsai, 1994; Miller és mtsai, 1994). Vizsgálatainkban a kiindulási Mv9 kr1 × Igri hibridben pollenanyasejtenként 0,03 búza-árpa bivalenst találtunk, amely kisebb volt annál, amennyit Miller és munkatársai (1994) a búza és a rozs kromoszómák közt a Chinese Spring × Petkus hibridben tapasztaltak, de nagyobb volt annál, amennyit Mettin és munkatársai (1976) és Schlegel és Weryszko (1979) búza × rozs hibridekben C-sávozással kimutattak. A búza-búza kromoszómakar asszociációk száma (az összes 85%-a) kicsit több volt, mint ahányról Miller és munkatársai (1994) búza × rozs hibridekben beszámoltak, de kisebb volt annál, mint ahányat Mettin és munkatársai (1976) és Schlegel és Weryszko (1979) megfigyeltek. Célszerű lenne még több sejtet bevonni a vizsgálatokba, hogy általános érvényű konklúziót vonhassunk le a búza × árpa hibridekben a kromoszómák közti párosodás gyakoriságáról, azonban ebben

a kombinációban hibridek előállítása nagyon nehéz, így nem bővíthető lényegesen a vizsgálatokba bevont növények száma.

A búza \times árpa hibrideket szövettényészetben elszaporítottuk, így több regeneráns hibrid állt rendelkezésre a GISH vizsgálatokhoz. Az *in vitro* szaporítás után a búza és az árpa kromoszómák közti asszociációk száma megnőtt. Korábban már a reciprok, árpa \times búza hibridek *in vitro* szaporítása után is megfigyeltük, hogy nőtt a kromoszóma asszociációk száma (Molnár-Láng és mtsai, 1991). Mindkét hibrid kombinációban (Mv9 kr1 \times Igri, Asakaze komugi \times Manasz) Feulgen festéssel megfigyeltük, hogy a szövettényésztés után megnőtt a kromoszóma asszociációk száma. Hasonló megfigyelésre jutott Dahleen (1999) is árpa \times kanadai vad rozs hibridekben szövettényésztés után. Kromoszómaszám és szerkezetbeli megváltozásokat írtak le már korábban is a szövettényészetben regenerált növényeken (Larkin és Scowcroft, 1981). Ezek az átrendeződések, számbeli megváltozások felhasználhatók az interspecifikus és intergenerikus hibridek genetikai manipulációjára (Lapitan és mtsai, 1984; Fedak és Grainger, 1986). Megfigyeléseink szerint a regeneráns hibridek megnövekedett fertilitásának egyik oka lehet meiózisban a helyreállított kromoszómaszámú sejtmagok (restitution nuclei) nagyobb arányú előfordulása. Ezekben a sejtmagokban a meiózis metafázis I. szakaszában a 28 univalens kromoszóma az equatoriális síkban marad és nem megy át az anafázis I. szakaszra, azonban általában bekövetkezik még egy osztódás. A keletkező diádok és tetrádok tartalmazzák a hibrid mind a 28 kromoszómáját.

A hibridek *in vitro* szaporítása nemcsak arra alkalmas, hogy nagy számban hozzunk létre hibrid növényeket egyes nehezen keresztezhető kombinációkban, hanem arra is, hogy nagyobb arányban indukáljunk intergenerikus kromoszóma-párosodásokat, amelynek eredménye lehet rekombinánsok létrejötte. A szövettényésztéssel a hibridek fertilitását is javíthatjuk, ezáltal teljesen steril hibrideken állíthatunk elő visszakeresztezéssel utódokat.

A regenerált búza \times árpa hibridek meiózisában GISH-sel kimutatott búza-árpa kromoszóma-párosodások bizonyítják, hogy lehetséges rekombinánsok előállítása a két nemzetség között. Búza-árpa rekombinánsok előállításáról először Islam és Shepherd (1992a) számoltak be. A Chinese Spring \times Betzes hibrid *in vitro* szaporítása után öt különböző búza-árpa rekombináns vonalat tudtunk kiválogatni, amelyek a szövettényészetben elszaporított hibridekben létrejött búza-árpa kromoszóma-párosodások eredményeként jöhettek létre (Molnár-Láng és mtsai, 2000a). A búza és az árpa kromoszóma-párosodások lehetővé teszik rekombinánsok előállítását, amelynek révén az árpa egyes tulajdonságai (koraiság, abiotikus stressz tűrés és minőségi paraméterek) beépíthetők a búzába.

Búza/árpa addíciók előállítása

Kromoszóma azonosítás

A búza kromoszómák a pSc119.2 és a pAs1 illetve a GAA és a pAs1 próbák kombinációjával FISH-sel azonosíthatók (Mukai és mtsai, 1993b; Pedersen és Langridge, 1997). A pSc119.2 és a pAs1 próbák kombinációjával a 21 búza kromoszómából 19 jól felismerhető, a két jelöletlen kromoszóma (3A, 6A) azonban méretük alapján is megkülönböztethető. Az általunk használt Mv9 kr1 búzavonal hibridizációs mintázata kismértékben eltért a korábban leírt Chinese Springétől. Az Mv9 kr1 1B és 6B kromoszómáinak szatellitjén pSc119.2 hibridizációs jeleket figyeltünk meg, amelyek a Chinese Spring kromoszómáin nem jelentek meg (Schneider és mtsai, 2003). A GAA és a pAs1 próba kombinációjával minden egyes búza kromoszóma azonosítható, azonban a GAA mintázatának összetettsége miatt az utóbbi próbával való elemzés sokkal nehezebb feladat, mint a pSc119.2 próbával. A pSc119.2 próba az árpán elszórt jelet ad, annak azonosítására nem alkalmas (Schneider, 2001; Pickering és mtsai, 2006), ezzel szemben a GAA szekvencia felhasználható az árpa kromoszómák elkülönítésére is (Pedersen és mtsai, 1996).

A GAA trinukleotid szekvencia FISH hibridizációs mintázata az árpán a C-sávokhoz hasonló, különösen a 2H és a 4H kromoszómákon. C-sávozásnál a legheterokromatikusabb kromoszóma a 4H (Jensen és Linde-Laursen, 1992; Linc és Lángné Molnár, 2003), és a GAA próbával végzett FISH után is a legtöbb hibridizációs jelet ezen a kromoszómán kaptuk. A 2H árpa kromoszómán ezzel a próbával szimmetrikus FISH hibridizációs jeleket tapasztaltunk mindkét kromoszómakaron a korábban megfigyelt C-sávokhoz hasonlóan. Az 5H és a 6H árpa kromoszómák szatellittel rendelkeznek, de kararányaik eltérők. Az 5H és a 6H kromoszómákon erős hibridizációs jelek figyelhetők meg a centroméra körül, de a NOR régióban nem tapasztaltunk FISH jeleket, holott ezen a szakaszon C-sávozásnál erős sávok láthatók (Linc és Lángné Molnár, 2003). Az 1H, 3H és a 7H kromoszómák megkülönböztetése a legnehezebb, mert ezeknek a kromoszómáknak a hibridizációs mintázatai nagyon hasonlóak. A Pedersen és munkatársai (1996) által leírt GAA hibridizációs jelek egy része a kísérletek zömében nem jelent meg, inkább csak a kromoszómák proximális régiójában a centroméra körüli jelek voltak láthatóak.

Az árpa kromoszómák azonosítását a HvT01 szubtelomérás ismétlődő szekvenciával és a pTa71 próbával végzett FISH-sel is kiegészítettük. Schubert és munkatársai (1998) megfigyelései szerint a 2H és az 5H kromoszómák hosszú karján gyenge HvT01 jelek láthatók, de ezek a jelek laboratóriumunkban a kísérletek jelentős hányadában nem jelennek

meg. Az 5H és a 6H kromoszómák megkülönböztetését lehetővé teszi, hogy a 6H kromoszóma karján határozott HvT01 jel van, míg az 5H hosszú karján gyakorlatilag nincs jel.

A pTa71 próba, amely a 18S-5.8S-26S riboszómális géneket tartalmazza, 5 pár árpa kromoszómán ad FISH jelet (Leitch és Heslop-Harrison, 1992). Két jelentős hibridizációs jel az 5H és a 6H kromoszómák NOR régiójában látható. Három kisebb jel az 1H, 2H és a 7H kromoszómákon látható, amelyek közül a legtöbb kópia az 1H kromoszómán van. A pTa71 próba segített saját kísérleteinkben az 1HS kromoszómakar azonosításában. A HvT01 próba előnye, hogy búzán egyáltalán nem ad jelet, így az addíciós vonalakban az árpa kromoszómák jelenléte rögtön megállapítható, és a GAA illetve a pTa71 próbákkal kombinálva (HvT01-GAA, HvT01-pTa71) az egyes kromoszómák azonosíthatók.

Addíciós vonalak előállítása, morfológiai jellemzése

Mv9 kr1/Igri

Az Mv9 kr1 × Igri hibridből eddig négy diszómás addíciós vonalat állítottunk elő, melyek közül három (2H, 3H, 4H) tartalmaz teljes árpa kromoszómapárokat, és egy addíciós vonalban az 1HS izokromoszómapár található. Az Mv9 kr1 × Igri hibrid utódaiban a 4H kromoszóma átadódása volt a leggyakoribb. Három különböző BC₂ növény utódaiban mutattuk ki a 4H kromoszómát, míg a 2H, 3H és az 1HS izokromoszómát tartalmazó diszómás addíciós vonalak mind ugyanarról a BC₂ növényről származtak. Hasonló megfigyelésre jutottunk az Asakaze komugi × Manasz hibrid utódainak vizsgálatakor is, itt hat db BC₂ növényben tudtuk mikroszatellit markerekkel kimutatni a 4H kromoszómát, a többi kromoszóma kevesebb növényben volt jelen. Koba és munkatársai (1991) szerint is a 4H árpa kromoszóma eliminálódik a legkisebb gyakorisággal az utódokból.

A 2H, 3H és a 4H Mv9kr1/Igri addíciós vonalak jellegzetes kalászokkal rendelkeznek és hasonlítanak az Islam és munkatársai (1981) által előállított Chinese Spring/Betzes addíciós vonalakra. A 4H addíciós vonal különbözik legkevésbé a búzától. A 2H addíciós vonal hosszú, laza kalászokkal rendelkezik, ezzel szemben a 3H addíciós vonal kalászhosszai rövidek és nagyon tömöttek. A különböző árpafajták (Betzes, Igri) ezek szerint a kalász morfológiát hasonlóképpen befolyásolják.

Az idegen fajú addíciós vonalak hasznosak lehetnek a nemesítés és az alap kutatás számára egyaránt (Gale és Miller, 1987; Chang és de Jong, 2005). Az addíciós vonalak alkalmasak arra, hogy segítségükkel meghatározzuk a különböző tulajdonságokért felelős

gének kromoszómális lokalizációját és kiindulási anyagai lehetnek transzlokációk előállításának. Az utóbbi években felhasználják az addíciós vonalakat az addicionált kromoszómák áramlásos citometriával történő szétválogatására is (Kubalakova és mtsai, 2003). Felhasználhatók a kromoszómák genetikai és fizikai térképének összehasonlítására is. Az Mv9 kr1 őszi búzatörzs és az Igri őszi árpa kombinációjából előállított addíciós vonalakat felhasználhatók lesznek olyan gének térképezésére is, amelyek a tavaszi Chinese Spring/Betzes kombinációban nem találhatók meg (vernalizációs, fagyűrési gének). Az Mv9 kr1/Igri addíciós vonalakat az abiotikus stresszrezisztencia növelésének is kiindulási alapanyagai lehetnek, hiszen az árpafajtáknak általában jobb a só- és szárazságtűrése, mint a búzának (Colmer és mtsai, 2006; Molnár és mtsai, 2006; Molnár-Láng és mtsai, 2006).

Az 1H árpakromoszóma a nemesítés szempontjából különösen értékes géneket, többek közt a *Hor 1,2,3,4,5* tartalékfehérje strukturális géneket (Shewry és mtsai, 1990), a *Lys 4* lizintartalmat meghatározó gént, az *Ical* chymotripszin inhibitor gént, továbbá liztharmattal, sárga- és levél rozsdával szembeni rezisztenciáért felelős géneket (Wettstein-Knowles, 1990) hordoz. Elsőként Islam és munkatársainak (1981) sikerült a hét lehetséges búza/árpa diszómás addíciós vonalból hatot előállítania, azaz a Betzes árpa 2H, 3H, 4H, 5H, 6H és 7H kromoszómapárját hozzáadnia a Chinese Spring búza genomhoz. Az 1H árpa kromoszómapárt tartalmazó fertilis diszómás addíciós vonal előállítása nem sikerült, mert az 1H kromoszóma hosszú karján meiotikus rendellenességeket, majd sterilitást okozó *Shw* gén helyezkedik el (Taketa és mtsai, 2002), de az 1H árpa kromoszóma rövid karját tartalmazó 1HS fertilis diteloszómás addíciós vonalat sikerült létrehozni (Islam és Shepherd, 1990). Később egy olyan vonalat állítottak elő, amely a 6H árpa kromoszómapár mellett tartalmazott egy heteromorf 1H/1HS kromoszómapárt is (Islam és Shepherd, 2000) és fertilis lett.

Az 1HS izokromoszómát tartalmazó diszómás addíciós vonal különböző genetikai vizsgálatokra alkalmas, mert fertilis és az 1H rövid karon található géneket négy kópiában tartalmazza. Ez a vonal megfelelő kiindulási anyag az 1HS karon lokalizált géneket hordozó transzlokációk előállítására. Gyakorlati szempontból is fontos eredménnyel kecsegtet az 1HS vonal koraiságának átvitele a búzába, ezáltal korai kalászosítású búzafajták előállítása. Az Mv9 kr1 × Igri hibrid Mv9kr1-el visszakeresztezett utódaiból több ezer szemmel rendelkezünk, amelyek közül a továbbiakban tervezzük kiválogatni a hiányzó (5H, 6H, 7H) addíciós vonalakat.

Az Asakaze komugi \times Manasz hibrid búzával történő visszakeresztezése még a szövettenyészetben regenerált utódokon is rendkívül nagy nehézségekbe ütközött. Három *in vitro* szaporítási ciklus után sikerült a regenerált növényeken Chinese Spring búzafajtaival végzett megporzással egy darab visszakeresztezett utódot kapni. Korábban már A. Comeau is megállapította (szóbeli közlés), hogy az Asakaze komugi búzafajtaival előállított hibrideket nehezebb visszakeresztezni, mint azokat, amelyet a Chinese Spring búzafajtaival hoztak létre. Wojciechowska és Pudelska (1993) és Jauhar (1995) is beszámoltak arról, hogy az előállított búza \times árpa hibridek teljes hím- és nősterilitást mutattak és nem sikerült azokat búzával visszakeresztezniük. GISH-sel elemeztük a több cikluson keresztül szövettenyészetben fenntartott búza \times árpa hibridek genom konstitúcióját. Megállapítottuk, hogy még a harmadik *in vitro* ciklus után is a hét árpa kromoszóma a legtöbb sejtben jelen volt. Tehát a nehezen előállítható távoli kombinációkban érdemes a nemzetséghibrideket szövettenyészetben addig fenntartani, amíg visszakeresztezéssel sikerül rajtuk utódot kapni.

A búza \times árpa hibridek utódainak genom-összetétele a GISH technika és a molekuláris markerek kombinálásával jól megállapítható (D. Nagy és mtsai, 2002; Malysheva és mtsai, 2003). Az Asakaze komugi \times Manasz hibridek BC₂ utódaiban csak egy deléciós 5H kromoszómát tudtunk kimutatni. Koba és mtsai (1991) is megfigyelték, hogy az 5H kromoszóma eliminálódik a legnagyobb gyakorisággal, ugyanakkor a 4H kromoszóma adódik át a legtöbbször. Az Asakaze komugi \times Manasz hibridek BC₂ utódai közt két növény bizonyult 4H monoszómás addíciónak, és miután ezek fertilitása is jó volt, először a 4H diszómás addíciót tudtuk kiválogatni. A vizsgált 130 utódszemből 3-ba került át mindkét árpa kromoszóma, azaz a diszómás addíció előfordulása az utódokban 2% volt. A többi kromoszómát tartalmazó monoszómás addícióból a diszómás addíciók kiválogatását nehezíti, hogy azokon a növényeken sokkal kevesebb szemet kaptunk, ezért a kiválogatáshoz több generáció felnevelése szükséges.

Az 1H árpa kromoszómát tartalmazó növények sterilek lettek, ami arra utal, hogy a Betzes árpafajta 1H kromoszómájának hosszú karján lokalizált *Shw* sterilitásért felelős gén a Manasz árpafajtaiban is megtalálható (Islam és mtsai, 1981; Taketa és mtsai, 2002).

A BC₂ utódokban mikroszatellit markerekkel mind a hét árpa kromoszómát ki tudtuk mutatni, tehát az *in vitro* regenerált hibridekből búzával való visszakeresztezés után mind a hét árpa kromoszóma átadódott az utódokba. Sajnos az 5H kromoszómából a BC₂ növényekben csak egy deléciós kromoszómát találtunk. Az Asakaze komugi \times Manasz

hibridek búzával visszakeresztezett utódai, a diszómás addíciók megfelelő kiindulási alapanyagok ahhoz, hogy az ukrán hatsoros őszi Manasz árpafajta kedvező tulajdonságait a búzába bevigyük.

Búza/árpa transzlokációk

A Chinese Spring \times Betzes búza \times árpa hibrid szövettényészetben regenerált utódain kapott BC₂F₂ szemek közt a GISH-sel kimutatott búza/árpa transzlokációk aránya viszonylag nagy volt. A vizsgált anyag több mint 20%-a tartalmazott búza/árpa transzlokációs kromoszómát, 51 szemből 12-ben mutattunk ki intergenerikus átrendeződést. Az árpa és a búza kromoszómák közt a párosodás ritka, még abban az esetben is, ha a *Ph1* gén hatását elnyomjuk. Islam és Shepherd (1988) megfigyelték, hogy még abban az esetben is, ha a búza/árpa 2HS diteloszómás addíciós vonalat az *Aegilops speltoides* egy jól párosodó vonalával keresztezik, az árpa telocentrikus és egy teljes búza kromoszóma közt a párosodás gyakorisága 4,5%. Kísérletüket Feulgen kromoszómafestéssel végezték, és a heteromorf bivalensek előfordulása alapján következtettek a két nemzetség közti párosodás gyakoriságára. Búza-árpa rekombinánsokat a 6HL kromoszómából 1,4%-os, a 3HL árpa kromoszómából 1,1%-os gyakorisággal találtak, amikor ezeket a diteloszómás búza/árpa addíciós vonalakat a *ph1b* mutáns vonallal keresztezték (Islam és Shepherd, 1992a). A rekombinánsok kiválogatása biokémiai markerek, izoenzim vizsgálatok alapján történt. A GISH alkalmas olyan átrendeződések kimutatására is, amelyek az izoenzim mintázat alapján esetleg nem követhetők. A GISH olyan kisebb idegen fajú kromoszómaszakaszok kimutatására is alkalmas, amelyek a vizsgált izoenzim lokuszait esetleg nem tartalmazzák, vagy nem hordoznak jellegzetes C-sávokat (Jiang és Gill, 1994). Előfordulhat, hogy a GISH-sel kimutatott rekombináns gyakoriság nagyobb lesz, mint az izoenzim elemzések szerint.

A Chinese Spring \times Betzes búza \times árpa hibridből a búzával visszakeresztezett, majd öntermékenyített utódok közül homozigóta búza/árpa transzlokációkat hordozó vonalakat válogattunk ki. A transzlokációs vonalakban a búza kromoszómákat (szegmentumokat) FISH-sel, a pSc119.2 és a pAs1 repetitív próba segítségével, az árpa kromoszómákat (szegmentumokat) molekuláris markerekkel azonosítottuk. Három vonalban (TL1, TL4, TL5) az árpa kromoszóma-szegmentumon is figyeltünk meg pAs1 jelet. A pAs1 próba az árpán elszórt jelet ad, de ezek a jelek nem alkalmasak az árpa kromoszómák azonosítására (Schneider, 2001; Tsujimoto és mtsai, 1997). Az árpa kromoszóma-szegmentumok azonosítása a transzlokációkban molekuláris citogenetikai módszerekkel nem volt lehetséges,

ezért erre a célra PCR alapú molekuláris markereket használtunk. Ramsay és munkatársai 2000-ben közöltek egy nagy felbontású genetikai térképet az árpáról, ahol 242 mikroszatellit marker elhelyezkedését írták le a kromoszómákon. Ezek közül 45 markert teszteltünk a búza/árpa transzlokációs vonalakon. Néhány marker ugyan halvány sávot adott, de mindegyik markerrel egysávós PCR terméket kaptunk.

Az öt transzlokáció közül négy nem homeológ és egy homeológ kromoszómák közt jött létre. Vizsgálataink alátámasztják, hogy a szövettenyésztés a besugárzáshoz hasonlóan véletlenszerű kromoszómatöréseket okoz, aminek következtében a nem homeológ kromoszómák közt jönnek létre transzlokációk (Friebe és mtsai, 1996a).

Fizikai térképezés

Künzel és munkatársai (2000) árpa intragenomikus transzlokációk segítségével több mint 300 RFLP alapú PCR markert térképeztek fizikailag az árpán. Az Igri × Franka térképezési populáción Graner és munkatársai (1991, 1993) által elkészített genetikai térképet használták fel kiindulási alapanyagul. Az 1H kromoszómára térképezett 24 RFLP marker közül 7 (29,2%) helyezkedett el az 1H kromoszómák közepén lévő transzlokációs töréspont felett. A centroméra és a transzlokációs töréspont között egy marker sem volt. A Martonvásáron a Chinese Spring × Betzes hibridből búzával való visszakeresztezéssel, majd öntermékenyítéssel létrehozott TL1 transzlokációs vonalban a transzlokációs töréspont szintén az 1HS kromoszómák közepén található, a kromoszómák disztális fele épült be a búzába. A transzlokálódott kromoszóma-szegmentumon az 1H árpa kromoszómán Ramsay és munkatársai (2000) által térképezett mikroszatellit markereknek csak a 12,7%-a található.

Az 5HS kromoszómákra korábban térképezett három terminális markert nem tudtuk kimutatni sem a Betzesből, sem az Igri árpafajtából származó 5HS kromoszóma-szegmentumot hordozó transzlokációs vonalakban (TL4, TL5). Ezek a markerek nem adtak megfelelő terméket a Chinese Spring/Betzes 5H addíciós vonalban sem, annak ellenére, hogy a kiindulási árpafajtákban (Betzes, Igri) jelen voltak. A Ramsay és munkatársai (2000) által az 1H kromoszómán térképezett EBmac0783 marker viszont az 5H kromoszómát (szegmentumot) tartalmazó vonalakban (TL4, TL5, 5H addíció) megjelent. Megfigyeléseink alapján feltehető, hogy az 1HL és az 5HS kromoszómák terminális szakaszai közt egy intragenomikus transzlokáció mehetett végbe az Igri és a Betzes árpafajtákban, vagy inkább azoknak egy közös őseben. A másodlagos befűződés jelenléte a TL4, a TL5 és az 5H

diszómás addíciós vonalakban arra utal, hogy ez az átrendeződés a szatellit régióban mehetett végbe.

Összesen 5 markert térképeztünk fizikailag az 5HS kromoszómakaron. A Bmag0387 marker, amely a genetikai térképen a centromérához legközelebb helyezkedett el, a transzlokációs töréspont felett található, tehát fizikailag a kromoszómakar közepétől disztális irányban lokalizált. Az 5HS karról eliminálódott markerek (Bmac306, Bmac303, Bmac0163) csak a szatellit régióban helyezkedhettek el, mert a másodlagos befűződés az 1HL és az 5HS közti transzlokáció után megmaradt. Az Ebmac560b, amelyet a Bmac0163 és a Bmac0303 között térképeztek, szintén a szatellit régióban lehet. A TL4 és a TL5 vonalban a búza-árpa transzlokációs töréspont (TB) és a szatellit régióban kimutatott árpa intergenomikus töréspont (Tba) között mindössze egy markert (Bmag0387) találtunk. Nem tudjuk, hogy ez a marker a szatellit régióban helyezkedik-e el, vagy a másodlagos befűződéstől proximális irányban található. Künzel és munkatársai (2000) az 5HS kromoszómakaron négy RFLP markert térképeztek. Mind a négy marker a szatellit régióban volt, egy markert sem találtak a másodlagos befűződéstől proximális irányban. Saját kísérleteink és Künzel és munkatársai (2000) munkája alapján is megállapítható, hogy a genetikai és a fizikai térképek között jelentős eltérések lehetnek.

Deléciós kromoszómák felhasználása a fizikai térképezésre

Az Asakaze komugi \times Manasz BC₂ utódok közt az egyik növényben egy 5H deléciós kromoszómát mutattunk ki. Az 5HL kromoszómakaron lokalizált öt vizsgált marker közül egyet sem sikerült kimutatni a deléciós vonalban, ami arra utal, hogy ezek a markerek a deléciós törésponttól disztális irányban helyezkednek el. Az ötből három marker (Bmag0337, Bmag0394, Bmag0323) pedig a centromérához legközelebb térképezett marker volt.

Ha a deléciós vonalon kapott eredményeket összevetjük a Chinese Spring \times Betzes, majd az Mv9 kr1 \times Igri hibridből létrehozott TL4 és TL5 búza-árpa transzlokációs vonalakon kapott eredményekkel, akkor megállapíthatjuk, hogy a két fizikai határjelző között (transzlokációs töréspont, deléciós töréspont) egy korábban genetikailag térképezett mikroszatellit marker sem található. A két határjelző közti szakasz az 5H árpa kromoszóma kb. 40%-át jelenti, ami a genetikai térképen 1 cm-nak felel meg, a teljes 5H kromoszóma pedig 187 cm hosszú (Ramsay és mtsai, 2000). Ezek az eredmények is alátámasztják, hogy a rekombináció az árpa kromoszómák disztális szakaszán megy végbe, ahogy ezt korábban Lukaszewski (1995) búza és rozs kromoszómákon is megfigyelte.

Búza/árpa transzlokációk morfológiai tulajdonságai

A TL1, TL4 és a TL5 transzlokációs vonalak növénymagassága szignifikánsan elmaradt az Mv9 kr1 szülőpartnerétől. Az 5HS kromoszóma-szegmentumot tartalmazó vonalak (TL4, TL5) csökkent növénymagasságát valószínűleg az 5HS kromoszómakaron lokalizált, növénymagasságért felelős gének befolyásolhatják, hiszen a két vonalban két különböző búza kromoszóma-szegmentum (4DS, 7DS) helyére épült be az árpa. Koba és munkatársai (1997) is hasonló megfigyelésre jutottak, amikor az 5HS kromoszómakart építették be a búzába. Az 1HS kromoszóma-szegmentumot tartalmazó TL1 vonal lett a legalacsonyabb. Ebben az esetben valószínű, hogy a 2DL kromoszómakar egy szegmentumának hiánya miatt lettek a növények nagyon alacsonyak, miután ismert, hogy ezen a kromoszómakaron növénymagasságot befolyásoló gének vannak (McIntosh, 1988). A transzlokációs vonalak fertilitása egy vonal kivételével jó. Mindegyik transzlokációs vonal jellegzetes kalászformával rendelkezik. A transzlokációk minden esetben stabilan öröklődtek. Az öt transzlokációban négy különböző árpa kromoszómából épültek át szegmentumok a búzába, az 1H, a 3H, a 4H és az 5H kromoszómából. A négy különböző árpa kromoszómából eredő transzlokáció alapján feltehetjük, hogy bármely árpa kromoszóma stabilan beépülhet a búza genomba.

A transzlokációs vonalakat tenyészkertben szaporítjuk és tovább vizsgáljuk, hogy az egyes árpa kromoszóma-szegmentumokon lokalizált gének a különböző agronómiai, minőségi tulajdonságokat hogyan befolyásolják. A búza/árpa transzlokációs vonalak alkalmasak az árpa kromoszómák fizikai térképezésére, így az árpa genetikai kutatásokhoz is kiváló alapanyagul szolgálnak.

5.2. Búza × rozs hibridek, amfidiploidok, rekombinánsok előállítása

Keresztezhetőség

Az Mv9 kr1 búzatörzs × Lovászpatonai rozsfajta keresztezésekor 68,4%-os szemkötést tapasztaltunk, amely búza × rozs keresztezésekben kiugróan magas értéknek számít (D. Nagy és mtsai, 1998). Korábbi kísérleteinkben (Lángné Molnár és Sutka, 1989) 15 búzafajta rozssal való megporzásakor a magyar búzafajták közül a legmagasabb szemkötési értéket, 15,4%-ot az Mv9 búzafajta adta, amelynek alapján feltételeztük, hogy az recesszív *kr2kr2* géneket hordoz. Az egyes genotípusok génkonstrukcióját Lein (1943) osztályozása alapján állapítottuk meg.

23. táblázat

A búzafajták kr génösszetétele és a rozssal való szemkötés összefüggése

Genotípus	Szemkötés
<i>Kr1Kr1Kr2Kr2</i>	kisebb mint 5%
<i>Kr1Kr1kr2kr2</i>	10-30
<i>kr1kr1Kr2Kr2</i>	30-50
<i>kr1kr1kr2kr2</i>	több mint 50%

Az Mv9 búzafajtával kaptuk a legmagasabb szemkötést rozssal, ezért a Chinese Spring búzafajtából, több éven át tartó visszakeresztezésekkel ebbe a genotípusba beépítettük a *kr1* gént is, így a rokon fajokkal egy jól kereszteződő búzatörzset állítottunk elő (Molnár-Láng és mtsai, 1996). A későbbiekben, 2005-ben tenyészkertben ismét vizsgáltuk 16 új magyar búzafajta és fajtajelölt (Mv Verbunkos, Mv Walzer, Mv 07-03, Mv12-04, Mv Petrence, Mv Táltos, Mv Csárdás, Mv Marsall, Mv Gorsium, Mv Irma, Mv Béres, Mv Kemence, Mv Magdaléna, Gk Élet, Gk Zombor, Gk Jászság) rozssal való keresztezhetőségét, ahol a maximális szemkötési érték 2,6% volt. Megfigyeléseink egybevágóak Falk és Kasha (1981) adataival, akik megállapítják, hogy az 5-40% közötti szemkötési értéket adó búzafajták között nem található egyetlen „közönséges” háttérű búzafajta sem. Kivételt képezett a Bánkúti 1201 búzafajtából Kiss (1968) által kisselektált törzs, amely 1953-ban rozssal való megporzásakor kiugróan magas, több mint 50%-os szemkötést mutatott. A rozssal végzett megporzásokban 40%-nál nagyobb szemkötést adó fajták általában a Chinese Springre

vezethetők vissza. Zeven (1987) szerint a *kr* allélok Kínában, Japánban, Kelet-Szibériában és Iránban fordulnak elő. Riley és Chapman (1967) szerint a *kr* allélok azért maradhattak fent Kelet-Ázsiában, mert ott a legutóbbi időkig nem fordult elő rozs, így nem volt szükség az idegen fajokkal szembeni védelemre. Európában, Nyugat-Ázsiában szükséges volt a rozssal való spontán kereszteződés gátlása, így az európai fajták között rozssal jól kereszteződő genotípus nem fordul elő, kivéve a távoli keresztezések segítségével előállított Roazon búzafajtát, amelynek genotípusa Stefanowska és Cauderon (1983) szerint *kr1kr1Kr2Kr2*, illetve a Bánkúti 1201-ből kisselektált búzatörzset (Kiss, 1968).

Snape és munkatársai (1979) különböző búzafajták rozssal és *Hordeum bulbosum*-mal való keresztezésekor megállapították, hogy szoros összefüggés van a két különböző nemzetséghez tartozó fajokkal történő termékenyülés közt. Falk és Kasha (1981) szintén arra a következtetésre jutott, hogy elsősorban a *Kr1* és a *Kr2* lokuszban lévő allélok határozzák meg a búza rozssal és *Hordeum bulbosum*-mal való keresztezhetőségét. Thomas és munkatársai (1980) szerint a rozssal jól kereszteződő búzafajták az *Aegilops*, *Agropyron*, *Elymus* fajokkal végzett megporzásokban is magasabb szemkötést adnak, mint a rozssal gyengén kereszteződő fajták. Saját korábbi vizsgálatainkban is a *Triticum timopheevii* Zhuk. ssp. *araraticum* fajjal végzett megporzásokban az Mv9 *kr1* genotípuson lényegesen nagyobb szemkötést kaptunk, mint az Mv 9 fajtán (Farshadfar és mtsai, 1994). Az árpával végzett megporzásokban az Mv9 *kr1* búzatörzsen kaptunk szemkötést a Chinese Springhez és az Asakaze komugi jól kereszteződő fajtákhoz hasonlóan, más termesztett magyar búzafajtán egyáltalán nem várható termékenyülés ebben a kombinációban.

Az Mv9 *kr1* búzatörzs tehát kiváló kiindulási alapanyagul szolgál búza-rozs idegen fajú génátviteli kísérletekhez, illetve más idegen fajú keresztezésekhez is.

Búza × rozs amfidiploidok fertilitása, rekombináns előállítás

Kolchicin kezeléssel sikerült az Mv9 *kr1* × Lovászpatonai hibridből részlegesen fertilis amfidiploidot előállítani. A kolchicin kezelés utáni első nemzedéken (C_0) a fertilitás még nagyon kicsi volt, de a következő nemzedékekben ez jelentősen megnövekedett, Belea (1986) megfigyeléseihez hasonlóan. Az amfidiploidokat egy 1B/1R transzlokációt hordozó búzafajtával (Matador) megporoztuk azzal a céllal, hogy a Matador fajtába beépült Petkus kromoszómakart a Lovászpatonai rozs kromoszómákra cseréljük. Vizsgáltuk a keresztezésből előállított F_1 hibrideket, hogy előfordul-e párosodás a Matador fajtából származó 1B/1R transzlokációs kromoszóma és az amfidiploidba beépült Lovászpatonai rozs

kromoszóma közt (D. Nagy és Molnár-Láng, 2000). A GISH kiváló módszernek bizonyult arra, hogy búza-rozs hibridekben a két nemzetség közti kromoszóma-párosodás gyakoriságát megállapítsuk (King és mtsai, 1994). Búza-árpa hibridekben is sikerrel alkalmaztuk ezt a módszert a két faj közti párosodás előfordulásának megállapítására (Molnár-Láng és mtsai, 2000b). Ezzel a módszerrel vizsgálni tudtuk, hogy a különböző rozsfajtákból származó 1RS kromoszómakarakok közt várható-e rekombináció. Korábban Singh és munkatársai (1990), majd Marais és munkatársai (1994) C-sávozással elemezték az 1B/1R és az 1R kromoszómák közti párosodási gyakoriságot. Megállapították, hogy a kromoszóma-párosodások száma meghaladta a később kapott rekombinánsok számát. Homológ rekombinációval sikerült Marais és munkatársainak (1994) a Turkey 77 rozsfajta 1RS kromoszómakarját beépíteni a búzába. A meiotikus kromoszóma-párosodás gyakorisága a Petkus 1RS és a Turkey 77 rozs 1R kromoszómája közt 32% volt, a rekombinációs gyakoriság viszont csak 13,2% lett. Kísérleteinkben a Petkus és a Lovászpatonai rozs kromoszómák közt megfigyelt kromoszóma asszociációk (32,8%) és a rekombinánsok előfordulási gyakorisága (10,2%) is nagyon hasonló lett Marais és munkatársai (1994) adataihoz.

Az Mv9 kr1 × Lovászpatonai amfidiploid × Matador búzafajta keresztezéséből előállított hibridek F₃ utódnemzedékében 254 vizsgált szem közül 26 rekombináns egyedet találtunk. A szekalin mintázat kiváló biokémiai markernek bizonyult a Lovászpatonai rozs nyomon követésére, miután az Mv9 kr1 × Lovászpatonai amfidiploidok közül sikeresen válogattunk ki olyan vonalakat, amelyeknek szekalin mintázata lényegesen eltért a Petkus rozsétól. A rekombinánsokat fitotronban elszaporítottuk, majd tenyészkertben elvetettük. Az első két rekombinánsból felszaporított utódszemek sajnos 2005-ben levélrozsdaival fertőződtek, így ezek a vonalak feltehetően nem tartalmazzak új, hatékony levélrozsda rezisztencia géneket. A később kiválogatott rekombinánsok utódait 2005-ben vetettük el tenyészkertben, így azok részletes agronómiai vizsgálata 2006-ban várható.

Az 1BL.1RS a világon a legnagyobb területen termesztett idegen fajú transzlokáció (Bedő és mtsai, 1993; Rajaram és mtsai, 1983), ennek ellenére az 1RS karban eddig létrehozott genetikai variabilitás rendkívül kicsi (Marais és mtsai, 1994, Hsam és Zeller, 1997, Lelley és mtsai, 1999). A legtöbb munka elsősorban az 1RS transzlokáció méretének csökkentésére, azaz a szekalin gén és a rezisztencia gének szétválasztására irányult (Koeberner és Shepherd, 1986, Lukaszewski, 2000). A csoportunkban alkalmazott módszer segítségével tervünk a Lovászpatonai eredetű rekombinánsok mellett más különböző rozsfajtákból eredő rekombinánsok előállítása. Ennek érdekében több mint 50 különböző rozs genotípust gyűjtöttünk be, melyek közül PCR alapú markerekkel válogatjuk majd ki a Petkustól

lényegesen eltérő genotípusokat. Ezzel párhuzamosan a *kr1* gént beépítjük egy 1BL.1RS transzlokációt hordozó búzafajtába, hogy így a rekombinánsok előállításához egy megfelelő befogadó genotípust hozzunk létre.

5.3. Búza × *Aegilops biuncialis* hibridek, amfidiploidok, addíciós vonalak létrehozása

Az *Aegilops biuncialis* búzával való megporzásakor, az Mv9 kr1 búzatörzzsel 37,4%-os szemkötést értünk el, ami nagyobb annál, mint amennyiről Mustafaev és Piralov (1980) (30,2%) és Özgen (1983, 1984) (24,9%) beszámoltak. Feltehetően az Mv9 kr1-be beépített *kr1* génnek köszönhetően sikerült viszonylag nagymértékű szemkötést elérnünk. Saját kísérleteink is igazolják, hogy a rozssal több mint 50%-os szemkötést adó búza genotípusok az *Aegilops* fajokkal végzett megporzásokban is viszonylag nagyfokú szemkötést adnak (Thomas és mtsai, 1980). A hibridek előállításakor megfigyelt nagyarányú szemkötés viszont az első visszakeresztezésnél jelentősen visszaesett, 2,4% lett (Logojan és Molnár-Láng, 2000). Sok interspecifikus és intergenerikus hibridnél megfigyelték, hogy az F₁ hibrid búzával való visszakeresztezése a hibrid előállításánál sokkal nehezebb feladat (Belea, 1986). A szemkötés ezután a második, különösen a harmadik visszakeresztezésben jelentősen megnövekedett Belea (1986) megfigyeléseihez hasonlóan.

Az *Aegilops* fajok a búza másodlagos génforrásainak jelentős hányadát teszik ki. A másodlagos génforrások azok a búzával rokon fajok, melyeknek legalább egy genomja homológ a búzáéval (Friebe és mtsai, 1996a). Az *Aegilops* fajokat a szoros rokonsági kapcsolat alapján több szerző a *Triticum* fajokkal egy nemzetségbe sorolta (Bowden, 1959; Morris és Sears, 1967). Az utóbbi időben inkább elfogadott az az álláspont, hogy az *Aegilops* fajokat külön nemzetséggként kezeljük (van Slageren, 1994), ahogy azt korábban MacKey (1966) is javasolta.

Az *Aegilops* fajok közül az *Aegilops biuncialis*-sal hoztunk létre búza/*Aegilops* addíciós vonalakat. Az *Ae.* egy tetraploid *Aegilops* faj, amely U^bU^bM^bM^b genommal rendelkezik. Diploid ősei az *Aegilops umbellulata* (UU) és az *Aegilops comosa* (MM). Bár eddig számos búza/*Aegilops* addíciós vonalat hoztak létre, ezzel a fajjal még ilyen genetikai alapanyagokról nem számoltak be. Az első búza/*Ae. biuncialis* addíciós vonalakat csoportunkban sikerült előállítani (Schneider és mtsai, 2005). Az *Ae. biuncialis* értékes génforrás lehet a búzanemesítés számára, számos kedvező tulajdonsága miatt. Az *Ae. biuncialis* egyes vonalai nagyon jó szárazságtűréssel rendelkeznek, amelyet laboratóriumi körülmények között is igazoltunk (Molnár és mtsai, 2004). Az *Ae. biuncialis* általunk

felhasznált MvGB642 vonala szántóföldi körülmények között levélrozsdával, lisztharmattal, árpa sárga törpeség vírussal szemben rezisztensnek bizonyult azokban az években (2003, 2004, 2005), amikor a tenyészkertben más búzafajtákon és búzatörzseken intenzív fertőzést tapasztaltunk. Az *Ae. biuncialis* egyes vonalainak árpa sárga törpeség vírussal (Makkouk és mtsai, 1994), sárgarozsdával (Damania és Pecetti, 1990) és levélrozsdával szembeni rezisztenciájáról (Dimov és mtsai, 1993) már mások is beszámoltak.

Az addíciós vonalak kiváló kiindulási alapanyagai idegen fajú transzlokációk előállításának, amelyekben már csak a kívánt tulajdonságokért felelős géneket hordozó kromoszómaszakaszokat építjük be a búzába (Gale és Miller, 1987). Az addíciós vonalak alkalmasak az idegen kromoszóma hatásának tanulmányozására a búza genomban, a különböző gének kromoszómális lokalizációjának meghatározására, felhasználhatók az egyes kromoszómák áramlásos citometriával történő szétválasztására (Chang és de Jong, 2005; Kubalakova és mtsai, 2003).

Friebe és mtsai (1999) az *Aegilops geniculata*-val hoztak létre addíciós vonalakat, amely az *Ae. Biuncialis*-hoz hasonló tetraploid faj. Genom összetétele $U^gU^gM^gM^g$, amelyben az U genom őse a diploid *Ae. umbellulata*, az M genom őse pedig az *Ae. comosa*. Az addíciós vonalak előállításához a Chinese Spring búzafajtát használták fel, ezzel szemben mi Martonvásáron az Mv9 kr1 búzatörzsszel dolgoztunk, annak érdekében, hogy az *Aegilops* géneket közvetlenül egy magyarországi éghajlati viszonyokhoz jól adaptálódott genotípusba építsük be. Elsősorban a különböző genetikai háttér, továbbá az *Ae. biuncialis* és *Ae. geniculata* fajok közti különbségek magyarázzák az eltéréseket a két fajjal létrehozott addíciós vonalak közt, de bizonyos fokú hasonlóságok is felfedezhetők.

A $2M^b$ búza/*Ae. biuncialis* addíciós vonal hasonlít a $2M^g$ búza/*Ae. geniculata* addícióhoz. A csoportunkban előállított $2M^b$ addíciós vonal szálkacsökevényekkel rendelkezik, és a kalász viszonylag hosszú. A $2M^g$ búza/*Ae. geniculata* addíciós vonal rövid szálkákkal rendelkezik és a kalász a búzához hasonló. A két fajjal előállított 7M addíciós vonalak a közölt fényképek alapján eltérnek egymástól, ennek magyarázatához további vizsgálatok szükségesek. Spanyol TÉT együttműködés keretében (Dr. Elena Benavente, Madridi Egyetem) vizsgálni kívánjuk az *Ae. geniculata* FISH mintázatát, amely az addíciós vonalakban megfigyelt eltérésekre részben magyarázatot adhat. A 3U és az 5U addíciós vonalakon a Friebe és mtsai (1999) által előállított vonalakban a Chinese Spring jelleg dominál, így a két fajjal létrehozott vonalak összehasonlítása nehéz. Friebe és mtsai (1999) nem közöltek részletes morfológiai adatokat az egyes vonalokról, így inkább a fényképekre és a rövid leírásra támaszkodhatunk. A későbbiekben a két faj egyes kromoszómái közti

homeológiát tesztkeresztezések után kívánjuk vizsgálni. Ennek érdekében beszereztük a búza/*Ae. geniculata* addíciókat, amelyeket a közeljövőben fel fogunk nevelni. A két fajjal előállított addíciós vonalakat keresztezve, az F₁ hibridek meiózisában vizsgálható a különböző *Aegilops* kromoszómák párosodása.

Az addíciós vonalak alkalmasak arra, hogy azokból kromoszóma-szegmentumokat vigyünk át a búzába. A búza és az *Ae. biuncialis* kromoszómái egymással nem párosodnak, ezért természetes rekombináció a hibridek utódaiban nem várható. A kromoszóma-átvitelhez vagy a homeológ kromoszóma-párosodás indukálása vagy a kromoszómák törésének elősegítése szükséges. Csoportunkban mindkét módszerrel megkezdjük az interspecifikus kromoszóma átrendeződések indukcióját az *Ae. biuncialis*-ból a búzába. A *ph* gén szupressziójával, illetve deléciójával kívánunk kromoszóma-párosodást elérni a búza és az *Ae. biuncialis* közt, továbbá besugárzással kromoszóma átrendeződéseket létrehozni. Az idegen fajú transzlokációk kimutatásának egyik kiváló eszköze a GISH (Le és mtsai, 1989; Schwarzscher és mtsai, 1989), amelyet a búza és az *Ae. biuncialis* kromoszómák megkülönböztetésére is alkalmazunk (Molnár és mtsai, 2005). A GISH annál nehezebb, genetikailag minél közelebb álló fajok genomját kívánjuk megkülönböztetni (Schwarzscher és mtsai, 1992), ezért a búza és az *Aegilops* kromoszómák differenciációjához a GISH egyes lépéseinek módosítása volt szükséges (Molnár és mtsai, 2005). A laboratóriumunkban kidolgozott és alkalmazott GISH alkalmas arra, hogy a tervezett transzlokációkat a búza háttérben pontosan kimutassuk.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben célul tűztük ki új búza \times árpa, búza \times rozs, búza \times *Aegilops biuncialis* hibridek létrehozását, majd a hibridekből búzával történő visszakeresztezésekkel az idegen fajnak már csak egy kromoszómáját, vagy csak szegmentumát hordozó addíciós vonalak illetve transzlokációk létrehozását. Tervbe vettük az előállított genetikai anyagokban a kromoszómák azonosítását molekuláris citogenetikai módszerekkel és molekuláris markerekkel. A létrehozott vonalakat felszaporítottuk és morfológiai, illetve agronómiai tulajdonságaikat részletesen elemeztük.

6. 1. Búza \times árpa hibridizáció

6.1.1. Őszi árpafajták felhasználásával új búza \times árpa hibrideket állítottunk elő három kombinációban (Mv9 kr1 \times Igri, Asakaze komugi \times Manasz, Mv9 kr1 \times Osznova). Két kombinációban a Martonvásári 9 kr1 búzatörzs volt az anyai partner. Az Mv9 kr1-be a Chinese Spring kínai tavaszi búzafajtából építettük be a *kr1* gént, ezáltal a magyarországi éghajlati viszonyoknak megfelelő, rokon fajokkal jól kereszteződő, jól adaptálódó genotípust hoztunk létre. Ezzel a búzatörzsszel kereszteztük az Igri német őszi kétsoros árpafajtát és az Osznova ukrán őszi hatsoros árpafajtát. A harmadik kombinációban egy japán jól kereszteződő búzafajta és egy ukrán őszi hatsoros árpafajta keresztezésével sikerült hibridet előállítanunk. A három árpafajta a korábban felhasznált Betzes tavaszi kétsoros árpafajtánál kedvezőbb agronómiai tulajdonságokkal rendelkezik, így várható előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező utódok létrehozása.

6.1.2. Az előállított búza \times árpa hibridek teljes hím- és nősterilitást mutattak, ezért azokat a hibridek fejlődő kalászkedeményeiből *in vitro* elszaporítottuk. Az Mv9 kr1 \times Igri hibridből 92, az Asakaze komugi \times Manasz hibridből 124 regeneráns hibridet neveltünk fel, mindkét kombinációban egy-egy kiindulási hibridből. Az Mv9 kr1 \times Osznova hibridet nem tudtuk szövettenyészetben elszaporítani.

6.1.3. A kiindulási búza \times árpa hibridek és a regeneránsok kromoszóma konstitúcióját és párosodását a meiózis I. metafázisában Feulgen módszerrel és genomikus *in situ* hibridizációval (GISH) elemeztük. Feulgen módszerrel az Mv9 kr1 \times Igri és az Asakaze komugi \times Manasz hibridben a sejtenkénti kromoszóma asszociációk száma 1,59 volt. A

regenerált hibridekben a kromoszóma asszociációk száma 4,72-re és 2,67-re növekedett a két különböző kombinációban. GISH-sel a hibridekben egyértelműen meg tudtuk különböztetni a búza és az árpa kromoszómákat. A két nemzetség kromoszómái között kromoszóma-párosodásokat találtunk, amelyek a kiindulási Mv9 kr1 × Igri hibridben az összes kromoszóma asszociációk 3,6%-át tették ki. A búza-árpa kromoszómakarok közti asszociációk aránya az *in vitro* regenerált Mv9 kr1 × Igri kombinációban az összes 16,5%-ára, az Asakaze komugi × Manasz regeneránsokban az összes 6,6%-ára növekedett.

6.1.4. Az Asakaze komugi × Manasz hibridet három egymást követő *in vitro* ciklusban szaporítottuk, míg végül sikeresen tudtuk búzával visszakeresztezni. A három egymást követő ciklusban regenerált hibridek meiózisének I. metafázisában GISH-sel vizsgáltuk a búza és az árpa kromoszómák számát, a párosodásokat illetve az átrendeződéseket. A regeneránsok többségében még a harmadik *in vitro* ciklus után is megfigyelhető volt a hét árpa kromoszóma, így a szövetenyésztés alkalmas a nehezen előállítható hibridek hosszú időn át tartó fenntartására. A harmadik *in vitro* ciklus után nőtt a telocentrikus kromoszómák száma, nőtt a búza-árpa kromoszómakar asszociációk száma és búza-árpa transzlokációkat figyeltünk meg egyes regeneránsokban.

6.1.5. A szövetenyésztésben elszaporított Mv9 kr1 × Igri és az Asakaze komugi × Manasz hibrideket búzával visszakeresztezve BC₁, majd BC₂ nemzedékeket állítottunk elő, melyek többségében fertilisek lettek. A BC₂ nemzedék öntermékenyítéséből származó utódok közül 43 kromoszómaszámú monoszómás, majd 44 kromoszómaszámú diszómás addíciós vonalakat állítottunk elő.

6.1.6. Az addíciós vonalak azonosításának érdekében FISH-sel repetitív DNS próbák segítségével azonosítottuk a búza és az árpa egyes kromoszómáit. A búza kromoszómákat a pSc119.2 és a pAs1 ismétlődő szekvencia, az árpa kromoszómákat a GAA trinukleotid, a HvT01 szubtelomérás ismétlődő szekvencia és a pTa71 riboszómális DNS szekvenciát hordozó próba segítségével azonosítottuk.

6.1.7. Az Mv9 kr1 × Igri hibridből 2H, 3H, 4H és 1HS izokromoszómát hordozó diszómás addíciós vonalakat állítottunk elő. Az addíciós vonalakban a kromoszómákat FISH-sel azonosítottuk, majd azt molekuláris markerekkel is megerősítettük. Az addíciós vonalakat elszaporítottuk és azok egyes morfológiai és agronómiai tulajdonságait jellemeztük. Az Mv9

kr1 × Igri hibrid búzával visszakeresztezett utódaiból még több száz szemmel rendelkezünk, melyek közül tervezzük kiválogatni az 5H, 6H és a 7H kromoszómákat hordozó addíciós vonalakat.

6.1.8. Az Asakaze komugi × Manasz hibrid búzával kétszeresen visszakeresztezett utódaiban GISH-sel megállapítottuk az árpa kromoszómák számát és molekuláris markerekkel azonosítottuk azokat. A 16 felnevelt BC₂ növényben mind a 7 árpa kromoszóma kimutatható volt. A BC₂ nemzedék öntermékenyített utódai közül eddig egy 4H Asakaze komugi/Manasz diszómás addíciós vonalat válogattunk ki. Ebből a kombinációból rendelkezünk 3H, 6H és 7H monoszómás addíciókkal, melyekből tervezzük diszómás addíciók kiválogatását. A diszómás addíciók már viszonylag stabilan fenntarthatók, fertilisek és megfelelő kiindulási alapanyagok transzlokációk előállításához.

6.1.9. Az Asakaze komugi × Manasz hibridek búzával visszakeresztezett BC₂ nemzedékében két deléciós kromoszómát (3HS, 5HS) és egy búza-árpa transzlokációs kromoszómát találtunk. Ezek a kromoszómák felhasználhatók voltak az árpa mikroszatellit markerek fizikai térképezésére.

6.1.10. A korábban Martonvásáron előállított Chinese Spring × Betzes hibrid szövettenyészetben regenerált utódain Mv9 kr1 búzatörzsszel végzett megporzásból kapott BC₂ nemzedékében ötféle búza-árpa transzlokációs kromoszómát figyeltünk meg. A GISH-sel vizsgált 51 szemből 12-ben mutattunk ki búza-árpa transzlokációt.

6.1.11. A búza-árpa transzlokációkat hordozó növények utódaiból homozigóta transzlokációkat hordozó egyedeket válogattunk ki, melyek a transzlokáció mellett már nem hordoztak más árpa kromoszómát, kivéve a TL1 vonalat, melyben a transzlokációs kromoszómapár mellett egy 4H kromoszómapár is volt.

6.1.12. A búza-árpa transzlokációkban a búza kromoszóma-szegmentumokat egymást követő GISH és FISH technika segítségével azonosítottuk, az utóbbiban a pSc119.2 és a pAs1 DNS próbát használtuk fel a kromoszómák azonosítására.

6.1.13. A búza-árpa transzlokációkban az árpa kromoszómák eredetét árpa mikroszatellit markerek segítségével határoztuk meg. A transzlokációs töréspont a kromoszómákon fizikai

határjelzőként szolgált, így a kromoszómák fizikai térképezését is lehetővé tette. A transzlokációs töréspont és a korábbi deléciós töréspont segítségével megállapítottuk, hogy az 5H kromoszóma kb. 40%-án egyetlen mikroszatellit marker sem található. Adataink alátámasztják, hogy a genetikai és a fizikai térkép lényegesen eltérhet. A centromérához genetikailag közel térképezett markerek fizikailag a centromérától sokkal messzebb helyezkednek el.

6.1.14. Egymást követő GISH és FISH, továbbá SSR markerek segítségével öt transzlokációs vonalat azonosítottunk: 2DS.2DL-1HS, 3HS.3BL, 6BS.6BL-4HL, 4D-5HS, 7DS.7DL-5HS. A transzlokációk közül csak egy kompenzáló típusú, a többi nem homeológ kromoszómák közt ment végbe. Ez is bizonyítja, hogy a szövettenyésztés hatására többnyire nem homeológ átrendeződések jönnek létre. A transzlokációkba az 1H, 3H, 4H és 5H kromoszóma különböző méretű szegmentumai épültek be, tehát valószínű, hogy bármely árpa kromoszómából lehetséges szegmentumokat beépíteni a búzába.

6.1.15. A búza-árpa transzlokációs vonalakat tenyészkertben felszaporítottuk és morfológiai tulajdonságaikat részletesen jellemeztük. Vizsgáltuk az egyes kromoszóma-szegmentumok hatását a növény morfológiai tulajdonságaira. Mindegyik vonalból megfelelő számú szemmel rendelkezünk a további vizsgálatokhoz.

6.2. Búza × rozs hibridek és rekombinánsok előállítása

6.2.1. Az Mv9 kr1 búzatörzset a magyar Lovászpatonai rozsajtával megporozva 68,4%-os szemkötést értünk el, amely búza × rozs keresztezésekben kiugró értéknek számít. A hibridet kolchicinnel kezelve oktoploid tritikálét állítottunk elő.

6.2.2. Az Mv9 kr1 × Lovászpatonai oktoploid tritikálé kromoszómaszámát Feulgen módszerrel meghatároztuk, a rozs kromoszómákat a búza genom mellett GISH-sel mutattuk ki.

6.2.3. Az Mv9 kr1 × Lovászpatonai oktoploid tritikálét az 1BL.1RS transzlokációt hordozó Matador búzafajtával megporozva F₁ utódokat hoztunk létre a transzlokációba beépült rozs kromoszómák kicserélésének céljával. Elemeztük az F₁ hibridekben a kromoszómák párosodását GISH-sel. A sejtek több mint 30% -ában jött létre párosodás a Matador búzafajta

1BL.1RS kromoszómája és a Lovászipatonai rozs 1R kromoszómája közt. Ennek alapján az utódok harminc százalékában várható rekombináció az 1RS karban.

6.2.4. Az [(Mv9 kr1 × Lovászipatonai) × Matador] BC₁F₃ nemzedékében a szekalin mintázat alapján 26 rekombináns genotípust válogattunk ki. A kiválogatást az tette lehetővé, hogy az Mv 9 kr1 × Lovászipatonai oktoploid tritikálé szekalin mintázata jól láthatóan eltért a Petkus rozsból származó kromoszómakart hordozó fajtákétól. A rekombinánsokat fitotronban és tenyészkertben felszaporítottuk. A rekombinánsokból előállított szemek elegendők lesznek ahhoz, hogy azok betegségrezisztenciáját és minőségét a közeljövőben részletesen elemezhessük.

6.3. Búza × *Aegilops biuncialis* hibridek, amfidiploidok, addíciók létrehozása

6.3.1. Az Mv9 kr1 × *Ae. biuncialis* keresztezéséből 35 kromoszómaszámú F₁ hibrideket állítottunk elő. Ebben a kombinációban is érvényesült az Mv9 kr1 rokon fajokkal való jó keresztezhetősége, a szemkötés 37,4% volt.

6.3.2. Az F₁ hibridek meióziséban Feulgen módszerrel többségében univalens kromoszómákat figyeltünk meg. Az F₁ hibridek kolchicin kezelése révén 70 kromoszómaszámú amfidiploidokat állítottunk elő, melyek már részleges fertilitást mutattak.

6.3.3. Az amfidiploidok búzával végzett kétszeres, esetenként háromszoros visszakeresztezése majd sorozatos öntermékenyítése után 43 kromoszómaszámú monoszómás, majd 44 kromoszómaszámú diszómás addíciós vonalakat állítottunk elő.

6.3.4. A búza/*Ae. biuncialis* addíciós vonalakban a kromoszómákat FISH-sel két repetitív DNS próba, a pSc119.2 és a pAs1 segítségével azonosítottuk. A 2M, 3M, 7M, 3U és az 5U addíciós vonalakban tudtuk az egyes *Ae. biuncialis* kromoszómák eredetét kimutatni FISH-sel. Egy vonalban az *Ae. biuncialis* kromoszóma még nem pontosan meghatározott.

6.3.5. A 2M, 3M, 7M, 3U és az 5U búza/*Ae. biuncialis* addíciós vonalakat fitotronban és tenyészkertben is elszaporítottuk és morfológiai tulajdonságaikat jellemeztük. Minden vonalból több ezer szem áll a rendelkezésünkre a további biotikus és abiotikus stressz vizsgálatokhoz. Az Mv9 kr1 × *Ae. biuncialis* hibridek utódaiból még több száz szemmel

rendelkezünk, melyek közül várható új *Ae. biuncialis* kromoszómákat hordozó monoszómás, majd diszómás addíciók kiválogatása.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Búza × árpa hibridizáció

1. Új búza × árpa hibrideket állítottunk elő, két őszi búza × őszi árpa (Mv9 kr1 × Igri, Mv9 kr1 × Osznova) és egy fakultatív búza × őszi árpa (Asakaze komugi × Manasz) kombinációban. A hibridekben (Mv9 kr1 × Igri, Asakaze komugi × Manasz) genomikus *in situ* hibridizációval (GISH) kimutattuk a búza és az árpa kromoszómák párosodását.

2. A búza × árpa hibridek szövetenyészetben való elszaporítása után GISH-sel kimutattuk a regeneránsokban a búza-árpa kromoszóma-párosodások számának emelkedését, a telocentrikus kromoszómák előfordulását, a búza/árpa transzlokációk létrejöttét és az amfidiploid sejtek keletkezését.

3. Az Mv9 kr1 × Igri és az Asakaze komugi × Manasz hibridekből búzával való visszakeresztezésekkel BC₁, majd fertilis BC₂ utódokat állítottunk elő. Az Mv9 kr1 × Igri kombinációból 2H, 3H, 4H és 1HS izokromoszómát tartalmazó diszómás, az Asakaze komugi × Manasz hibridből 4H diszómás, illetve 3H, 6H és 7H monoszómás addíciós vonalakat hoztunk létre és azokat FISH-sel azonosítottuk, majd elszaporítottuk.

4. A korábban létrehozott Chinese Spring × Betzes hibrid Mv9 kr1 búzatörzsszel végzett visszakeresztezéséből négy, az Mv9 kr1 × Igri hibridből egy homozigóta búza-árpa transzlokációt hordozó vonalat állítottunk elő. A transzlokációs kromoszómákat (2DS.2DL-1HS, 3HS.3BL, 6BS.6BL-4HL, 4D-5HS, 7DS.7DL-5HS) egymást követő GISH és FISH technikával, majd mikroszatellit markerekkel azonosítottuk.

5. A szövetenyészetben regenerált hibridekben létrejött transzlokációk és deléciók segítségével árpa kromoszómákat (1H, 3H, 5H) fizikailag térképeztünk.

Búza × rozs hibridek és rekombinánsok előállítása

6. Mv9 kr1 × Lovászpatonai oktoploid tritikálét állítottunk elő, és abban a rozs kromoszómákat GISH-sel demonstráltuk. Az Mv9 kr1 × Lovászpatonai oktoploid tritikálé és az 1BL.1RS transzlokációt hordozó Matador búzafajta keresztezéséből előállított F₁ hibridben

GISH-sel kimutattuk az 1BL.1RS kromoszómának a búza és rozs kromoszómákkal történő párosodását.

7. Az Mv9 kr1 \times Lovászipatonai tritikálé és a Matador búzafajta keresztezéséből származó utódokból új búza-rozs rekombinánsokat válogattunk ki, majd azokat felszaporítottuk.

Búza \times Aegilops biuncialis hibridek, amfidiploidok, addíciók előállítása

8. Az Mv9 kr1 \times *Ae. biuncialis* keresztezésből hibridet, majd amfidiploidot hoztunk létre. A hibridek búzával végzett visszakeresztezéséből, majd öntermékenyítéséből 2M, 3M, 7M, 3U, 5U és egy azonosítatlan kromoszómát hordozó búza/*Ae. biuncialis* diszómás addíciós vonalat állítottunk elő, majd azokban a kromoszómákat azonosítottuk FISH-sel. Az addíciós vonalakat elszaporítottuk és morfológiailag jellemeztük.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

Búza × árpa hibridizáció

Az új őszi búza × őszi árpa hibridek előállítása lehetővé teszi, hogy az Igri, Manasz és Osznova őszi árpafajták kedvező tulajdonságait építsük be a búzába a korábban a kísérletekben felhasznált Betzes genetikai modell tavaszi kétsoros árpafajta helyett. Az ukrán őszi hatsoros árpafajták (Manasz, Osznova) a magyarországi éghajlati viszonyokhoz jól adaptálódtak, a Betzesnél kedvezőbb agronómiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Az Igri egy őszi kétsoros árpafajta, amely a tavaszi Betzes fajtához képest más géneket (pl. vernalizáció) hordoz.

A hibridek *in vitro* szaporítása révén lehetővé vált, hogy a nehezen kereszteződő kombinációkból egy darab kiindulási hibrid növényből több száz regeneráns utódot állítsunk elő, így sikeresen tudtunk BC₁ utódokat létrehozni annak ellenére, hogy a kiindulási hibridek teljes hím- és nősterilitást mutattak.

A szövettenyészetben regenerált búza × árpa hibridek kromoszóma-összetételének és párosodásának GISH-sel végzett elemzése után megállapítottuk, hogy a hibridek szövettenyészetben hosszú időn át fenntarthatók, a hét árpa kromoszóma a regeneránsok többségében még három egymást követő *in vitro* ciklus után is kimutatható. A szövettenyésztés eredményként viszont gyakoribbá válnak a kromoszómatörések, nő a telocentrikus kromoszómák száma, transzlokációk, amfidiploid sejtek jönnek létre. A szövettenyésztés felhasználható kromoszóma-átrendeződések kiváltására, transzlokációk előállítására is.

Az Mv9 kr1/Igri diszómás addíciós vonalak előállítása lehetővé teszi, hogy meghatározzuk, hogy az Igri árpa egyes tulajdonságaiért felelős gének mely kromoszómákon lokalizáltak. Az addíciós vonalak fertilisek, citológiaiilag stabilak és alkalmas kiindulási anyagok ahhoz, hogy az Igri árpa egyes tulajdonságaiért felelős géneket (komplexumokat) a termesztett búzába beépítsük.

Az Asakaze komugi × Manasz hibridek búzával visszakeresztezett utódai megfelelő alapanyagok ahhoz, hogy azokból a hatsoros őszi ukrán árpafajta tulajdonságait a búzába átvigyük.

A korábban Martonvásáron előállított Chinese Spring × Betzes hibrid Martonvásári 9 kr1 búzatörzsszel visszakeresztezett utódai közül ötféle transzlokációs vonalat válogattunk ki. Ezekbe a transzlokációkba az 1H, 3H, 4H és az 5H kromoszóma különböző szakaszai épültek

be. Megfigyeléseink szerint tehát bármely árpa kromoszómából lehetséges transzlokációk előállítása a termesztett búzában. Később transzlokációkat állítottunk elő az Mv9kr1 \times Igri és az Asakaze komugi \times Manasz kombinációból is. A transzlokációk számának növelésével lehetséges lesz a kívánt kromoszómaszakaszokat hordozó transzlokációk létrehozása a búzában. A transzlokációs vonalak felszaporítása után válik majd lehetségessé az abiotikus rezisztencia, a minőségi paraméterek vizsgálata, amelyekhez nagy mennyiségű szem előállítása szükséges. A transzlokációs vonalak euploid kromoszómaszámúak, stabilan fenntarthatók, citológiai szempontból már a nemesítés számára átadhatók.

A búza/árpa transzlokációk és a szövettényészetben létrejött árpa deléciós kromoszómák a fizikai térképezés megfelelő eszközei lettek. A transzlokációs és a deléciós töréspont segítségével sikeresen térképeztünk mikroszatellit markereket az árpa kromoszómákon. A korábbi tapasztalatokhoz hasonlóan megállapítottuk, hogy a genetikai és a fizikai térkép közt jelentős eltérések lehetnek.

Búza \times rozs rekombinánsok előállítása

A Martonvásáron előállított Mv9 kr1 vonal megfelelő partnernek bizonyult búza \times rozs hibridek előállítására. Ezzel a búzatörzzsel több mint 50%-os szemkötést értünk el, míg a termesztett martonvásári búzafajtákban rozssal végzett megporzáskor 5%-nál kisebb szemkötést tapasztaltunk.

Az új rekombinánsok létrehozását a Lovászipatonai rozsajtával végeztük, miután ez a fajta több mint 40 éves termesztési tapasztalat alapján betegségekkel szemben általában rezisztens, levélrozsdával csak mérsékelten fertőződik, lisztharmattal szemben ellenálló. Az új, hatékony rezisztenciagének átvitelének érdekében először Mv9 kr1 \times Lovászipatonai oktoploid tritikálét hoztunk létre, majd azt az 1BL.1RS transzlokációt hordozó Mv Matador búzajtával kereszteztük. Az F₁ hibridben kimutatható volt GISH-sel a Petkusból származó 1RS és a Lovászipatonai 1R kromoszómája közti párosodás, ami igazolja a két rozs genotípus közötti rekombinációk létrejöttének valószínűségét. Ez a módszer alkalmas arra, hogy a továbbiakban bármely más rozs genotípusból rekombinációkat hozzunk létre.

A rekombinánsok létrejöttét a szekalin mintázat alapján bizonyítottuk. A rekombinánsokat tenyészkertben elvetve megkezdjük azok betegség-ellenállóságának vizsgálatát. Az első két rekombináns növény utódain levélrozsdával kismértékű fertőződést tapasztaltunk. A rezisztenciagének a rozsban a szekalint kódoló régiótól disztális irányban helyezkednek el, így feltehető, hogy a rezisztenciagéneket hordozó régióban is végbement

átrendeződés. A további rekombinánsok betegség-ellenállóságának vizsgálata még a közeljövőben várható. Ha a rekombinánsok között nem lehet levélrozsdával illetve lisztharmattal szemben nagymértékben ellenálló genotípusokat találni, akkor célszerű a keresztezésekbe újabb rozs genotípusokat bevonni, melyek várhatóan új rezisztenciagéneket hordoznak. A dolgozatban leírt keresztezések elvégzése után várható ismét új rekombinánsok előállítása. A rezisztencia mellett célszerű a rekombinánsok minőségvizsgálatát is elvégezni, hiszen az eltérő szekalin mintázat alapján feltehető, hogy azok minőségi paraméterei is eltérhetnek a korábbi Petkus 1RS kart hordozó fajtákétól.

Az 1RS.1BL transzlokáció a ma termesztett búzafajtákban jelentős mértékben elterjedt, a világban több millió hektáron jelen van, ezért érdemes erőfeszítéseket tenni az eddig uniform Petkus rozs kromoszómakar kicserélésére. A rozsfajták közt nagy genetikai változékonyság tapasztalható, várható új hatékony rezisztenciagének megtalálása. A búzában az 1RS kar jól kompenzálja a kieső búza kromoszómakart, így érdemes ennek a kromoszómakarnak a variabilitását növelni.

Búza × Aegilops biuncialis hibridek, addíciós vonalak előállítása

Az *Aegilops* fajok közül az *Ae. biuncialis*-sal eddig még nem hoztak létre búza/*Aegilops* addíciós sorozatot illetve nem állítottak elő ezzel a fajjal hasznos agronómiai tulajdonságokért felelős géneket hordozó transzlokációkat a búzában. Az *Ae. biuncialis* egyes vonalai betegségekkel szemben ellenálló, illetve só- és szárazságtűrők, ezért célszerűnek tűnik a búzanemesítés számára történő kiaknázása.

A búza × *Ae. biuncialis* hibridek, majd fertilis amfidiploidok előállítása az *Ae. biuncialis*-ból történő génátvitel első lépései. A búzával végzett visszakeresztezésekből, majd öntermékenyítésből származó addíciós vonalak lehetővé teszik, hogy meghatározzuk, hogy az *Ae. biuncialis* betegség-ellenállóságáért (levélrozsdá, szárrozsdá, lisztharmat), só- és szárazságtűréséért felelős gének mely kromoszómákon helyezkednek el. Ezek a vonalak kiváló kiindulási alapanyagok lehetnek majd transzlokációk előállításának. Az *Ae. biuncialis* kromoszómák azonosítása FISH-sel lehetővé tette, hogy pontosan megállapítsuk, hogy a különböző származékokba mely *Ae. biuncialis* kromoszómák épültek be. A pontos azonosítás az *Ae. biuncialis* fajból történő tudatos génátvitelt segíti elő. Az *Ae. Biuncialis*-sal előállított genetikai alapanyagok (hibridek, amfidiploidok, addíciók) lehetővé teszik, hogy ennek az *Aegilops* fajnak a kedvező tulajdonságait a búzanemesítés számára kiaknázzuk. A

dolgozatban leírt genetikai alapanyagok széles genetikai bázist jelentenek a további idegen fajú génátviteli munkához az árpából, a rozsból és az *Ae. biuncialis*-ból.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetem fejezem ki Bucsi Istvánné technikusnak, aki a dolgozatban leírt genetikai anyagok előállításában, citológiai elemzésében, felnevelésében, feldolgozásában 1987 óta aktívan közreműködött, továbbá Havasi Józsefné és Dr. Könyvesné Lakner Ildikó technikusoknak, akik 1995-ben, majd 2005-ben csatlakoztak a csoporthoz és mindig nagy szorgalommal vettek részt a feladatokban.

Köszönöm a Molekuláris Citogenetika Csoport kutatóinak, Dr. Linc Gabriella, Dr. D. Nagy Ervin, Dr. Szakács Éva tud. főmunkatársaknak, Dr. Schneider Annamária, Molnár István tud. munkatársaknak és Sepsi Adél tud. segédmunkatársnak az egyes kutatási témákban végzett munkájukat.

Hálás vagyok Dr. Sutka József professzornak, akitől a citogenetika elméletét és különböző módszereit megtanulhattam és aki a Molekuláris Citogenetika Csoport munkáját a korábbi Genetika Osztályon segítette.

Köszönöm Dr. Barnabás Beáta tud. igazgatóhelyettesnek, a Biológiai Szekció vezetőjének támogatását, és Dr. Bedő Zoltán igazgatónak, hogy a kutatási feltételek biztosítása mellett több mint húsz évvel ezelőtt felhívta a figyelmem a búza × árpa keresztezések elméleti és gyakorlati jelentőségére.

Köszönöm végül férjem, Dr. Láng László búzanemesítő biztatását és segítségét.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbo, S., Dunford, R.P., Miller, T.E., Reader, S.M., King, I.P. 1993. Primer-mediated *in situ* detection of the B-hordein gene cluster on barley chromosome 1H. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90: 11821-11824.
- Acosta, A.C. 1962. The transfer of stem rust resistance from rye to wheat. Diss. Abstr., 23: 34-35.
- Adonina, I.G., Salina, E.A., Efremova, T.T., Pshenichnikova, T.A. 2004. The study of introgressive lines of *Triticum aestivum* × *Aegilops speltoides* by *in situ* and SSR analyses. Plant Breeding, 123: 220-224.
- Aghaee-Sarbarzeh, M., Ferrahi, M., Singh, S., Singh, H., Friebe, B., Gill, B.S., Dhaliwal, H.S. 2002. *Ph¹* induced transfer of leaf and stripe rust-resistance genes from *Aegilops triuncialis* and *Ae. geniculata* to bread wheat. Euphytica, 127: 377-382.
- Aghaee-Sarbarzeh, M., Harjit-Singh, Dhaliwal, H.S. 2001. A microsatellite marker linked to leaf rust resistance transferred from *Aegilops triuncialis* into hexaploid wheat. Plant Breeding, 120: 259-261.
- Anonymous. 1972. Paris Conference (1971). Standardization in human cytogenetics. Birth Defects, Orig. Artic. Ser., 8: 7.
- Armstrong, K.C., Nakamura, C., Keller, W.A. 1983. Karyotype instability in tissue culture regenerants of Triticale (× *Triticosecale* Wittmack) cv. 'Welsh' from 6-month-old callus cultures. Z. Pflanzenzüchtg., 91: 233-245.
- Autrique, E., Singh, R.P., Tanksley, S.D., Sorrells, M.E. 1995. Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheat from wild relatives. Genome, 38: 75-83.
- Badaeva, E.D., Friebe, B., Gill, B.S. 1996a. Genome differentiation in *Aegilops*. 1. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species. Genome, 39: 293-306.
- Badaeva, E.D., Friebe, B., Gill, B.S. 1996b. Genome differentiation in *Aegilops*. 2. Physical mapping of 5S and 18S-26S ribosomal RNA gene families in diploid species. Genome, 39: 1150-1158.
- Badaeva, E.D., Amosova, A.V., Muravenko, O.V., Samatadze, T.E., Chikida, N.N., Zelenin, A.V., Friebe, B. and Gill, B.S. 2002. Genome differentiation in *Aegilops*. 3. Evolution of the D-genome cluster. Plant Syst. Evol., 231: 163-190.

- Badaeva, E.D., Amosova, A.V., Samatadze, T.E., Zoschchuk, S.A., Shostak, N.G., Chikida, N.N., Zelenin, A.V., Raupp, W.J., Friebe, B. and Gill, B. S. 2004. Genome differentiation in *Aegilops*. 4. Evolution of the U-genome cluster. *Plant Syst. Evol.*, 246: 45-76.
- Bai, D., Knott, D.R. 1993. The effects of level of 2,4-D and time in culture on regeneration rate and chromosome numbers of regenerants from calli of the hybrid *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring *ph1b* \times *Thinopyrum ponticum* ($2n = 10x = 70$). *Genome*, 36: 166-172.
- Balázs, E., Dudits, D. 1999. Molekuláris növénybiológia. Szemelvények. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp 706.
- Bálint, A.F., Kovács, G., Sutka, J. 2000. Origin and taxonomy of wheat in the light of recent research. *Acta Agr. Hung.*, 48: 301-313.
- Banks, P.M., Larkin, P.J., Bariana, H.S., Lagudah, E.S., Appels, R., Waterhouse, P.M., Brettell, R.I.S., Chen, X., Xu, H.J., Xin, Z.Y., Qian, Y.T., Zhou, X.M., Cheng, X.M., Zhou, G.H. 1995. The use of cell culture for subchromosomal introgressions of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyrum intermedium* to wheat. *Genome*, 38: 395-405.
- Barcelo, P., Hagel, C., Becker, D., Martin, A., Lörz, H. 1994. Transgenic cereal (tritordeum) plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue. *Plant Journal*, 5: 583-592.
- Barclay, I.R. 1975. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature (London)*, 256: 410-411.
- Barloy, D., Lemoine, J., Dredryver, F., Jahier, J. 2000. Molecular markers linked to the *Aegilops variabilis* derived root-knot nematode resistance gene *Rkn-mn1* in wheat. *Plant Breeding*, 119: 169-172.
- Bartos, P., Bares, I. 1971. Leaf and stem rust resistance of hexaploid wheat cultivars Salzmünder Bartweizen and Weique. *Euphytica*, 20: 435-440.
- Bartos, P., Stuchlikova, 1987. Odrudova odolnost psenic s zitnou rezistenci (1B/1R) ke rzi psenicné. (Varietal resistance of wheats with rye-type resistance (1B61R) to brown rust.) *Sbornik UVTIZ, Genetika a Slechte*, 23: 97-104.
- Bartos, P., Valkoun, J., Kosner, J., Slovencikova, V. 1973. Rust resistance of some European wheat cultivars derived from rye. In: *Proc. 4th Int.Wheat Genet. Symp.*, Columbia, Mo., pp 145-146.

- Bassam, B.J., Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 196: 721-728.
- Bedbrook, J.R., Jones, J., O'Dell, M., Thompson, R.J. and Flavell, R.B. 1980. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell*, 19: 545-560.
- Bedő, Z., Balla, L., Szunics, L., Láng, L., Kramarikné, Kissimon, J. 1993. A martonvásári 1B/1R transzlokációs búzafajták agronómiai tulajdonságai. *Növénytermelés*, 42: 391-398.
- Belea, A. 1986. Faj- és nemzetségkeresztezések a növényvilágban. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, pp 235.
- Belea, A., Kőszegi, B., Kramarikné, Kissimon J. 1991. A *Triticum* L. nemzetség evolúciójának néhány kérdése. *Növénytermelés*, 40: 79-87.
- Blanco, A., Fracchiolla, G.V., Greco, B. 1986. Intergeneric wheat × barley hybrid. *The Journal of Heredity*, 77: 98-100.
- Bommenini, V.R., Jauhar, P.P., Peterson, T.S., Chibbar, R.N., Almouslem, A.B., 1997. Analysis of hybrids of durum wheat with *Thinopyrum junceiforme* using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 757-763.
- Bothmer, R. von, Flink, J., Landström, T. 1986. Meiosis in interspecific *Hordeum* hybrids. I. Diploid combinations. *Can. J. Genet. Cytol.* 28: 525-535.
- Bothmer, R. von, Flink, J., Landström, T. 1987. Meiosis in interspecific *Hordeum* hybrids. II. Triploid hybrids. *Evol. Trends Plants*, 1: 41-50.
- Bowden, W.M. 1959. The taxonomy and nomenclature of the wheats, barleys, and ryes and their wild relatives. *Can. J. Bot.* 37: 130-136.
- Bryan, G.J., Collins, A.G., Stephenson, P., Orry, A., Smith, J.B., Gale, M.D. 1997. Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 94: 557-563.
- Cabrera, A., Friebe, B. Jiang, J. Gill, B.S. 1995. Characterization of *Hordeum chilense* chromosomes by C-banding and *in situ* hybridization using highly repeated DNA probes. *Genome*, 38: 435-442.
- Caspersson, T., Farber, S., Foley, G.E., Kudynowski, J., Modest, E.J., Simonsson, E., Wagh, U., Zech, L. 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 49: 219-222.
- Castilho, A., Miller, T.E., Heslop-Harrison, J.S. 1996. Physical mapping of translocation breakpoints in a set of wheat-*Aegilops umbellulata* recombinant lines using *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 93: 816-825.

- Ceoloni, C., Biagnetti, M., Ciaffi, M., Forte, P., Pasquini, M. 1996. Wheat chromosome engineering at the 4x level: the potential of different alien gene transfers into durum. *Euphytica*, 89: 87-97.
- Ceoloni, C., Del Signore, G., Pasquini, M., Testa, A. 1988. Transfer of mildew resistance from *Triticum longissimum* into wheat by *ph1* induced homeologous recombination. In: Miller, T.E., Koebner, R.M.D. (eds) Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp. Cambridge, UK. pp. 221-226.
- Chang, T.D., Kimber, G., Sears, E.R. 1973. Genetic analysis of rye chromosomes added to wheat. Proc. 4th Int. Wheat Gen. Symp., Columbia, MO: 151-153.
- Chang, S.B., and de Jong, H. 2005. Production of alien chromosome additions and their utility in plant genetics. *Cytogenet. Genome Res.*, 109: 335-343.
- Chapman, V., Miller, T.E. 1978. The amphiploid of *Hordeum chilense* \times *Triticum aestivum*. *Cereal Res. Commun.*, 6: 351-352.
- Chen, P.D., Tsujimoto, H., Gill, B.S. 1994. Transfer of *Ph¹* genes promoting homoeologous pairing from *Triticum speltoides* to common wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 97-101.
- Cheng, Z., Presting, G.G., Buell, C.R., Wing, R.A., Jiang, J. 2001. High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics*, 157: 1749-1757.
- Chu, C.C., Sun, C.S., Chen, X., Zhang, W.X., Du, Z.H. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration in callus from inflorescences of *Hordeum vulgare* \times *Triticum aestivum* hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 68: 375-379.
- Clauss, E. 1980. Trigeneric hybrids between barley, wheat and rye. *Cereal Res. Comm.*, 2: 341-347.
- Clauss, E. 1983. Bastarde aus *Hordeum geniculatum* All. Und *Triticum aestivum* L. *Arch. Züchtungforsch.* 13, 6: 413-418.
- Colmer, T.D., Flowers, T.J., Munns, R. 2006. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.*, 57: 1059-1078.
- Cuadrado, A., Schwarzacher, T., Jouve, N. 2000. Identification of different chromatin classes in wheat using *in situ* hybridization with simple sequence repeat oligonucleotides. *Theor. Appl. Genet.*, 101: 711-717.
- Cubero, J.I., Martin, A., Millan, T., Gomez-Cabrera, A., De Haro, A. 1986. Tritordeum: a new allopolyploid of potential importance as a protein source crop. *Crop Science*, 1986. 26: 6, 1186-1190.

- Dahleen, L.S. 1999. Tissue culture increases meiotic pairing of regenerants from barley × Canada wild rye hybrids. *J. Hered.* 90, 265-269.
- Damania, A.B., Pecetti, L. 1990. Variability in a collection of *Aegilops* species and evaluation for yellow rust resistance at two locations in Northern Syria. *J. Genet. Breed.*, 44: 97-102.
- Dewey, D.R. 1984. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial *Triticeae*. In: Gustafson, J.P. (ed) *Gene manipulation in plant improvement*. Plenum Publishing Corporation, pp 209-279.
- Dégen, Á. 1917. MTA Mathem. Termtud. Ért. 3-4: 459-477.
- Devos, K.M., Atkinson, M.D., Chinoy, C.N., Francis, H.A., Harcourt, R.L., Koebner, R.M.D., Liu, C.J., Masojc, P., Xie, D.X., Gale, M.D. 1993. Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 673-680.
- Dhaliwal, H.S., Harjit-Singh, William, M. 2002. Transfer of rust resistance from *Aegilops ovata* into bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and molecular characterisation of resistant derivatives. *Euphytica*, 126: 153-159.
- Dimov, A., Zaharieva, M., Mihova, S. 1993. Rust and powdery mildew resistance in *Aegilops* accessions from Bulgaria. In: Damania, A.B. (ed.) *Biodiversity and Wheat Improvement*. John Wiley & Sons, New York. pp. 165-169. Evaluation and utilization of biodiversity in wild relatives and primitive forms for wheat improvement, ICARDA, Aleppo, Syria, October 1992, pp. 165-169.
- Dosba, F., Doussinault, G., Rivoal, R. 1978. Extraction, identification and utilization of the addition lines *T. aestivum*-*Ae. ventricosa*. In: Ramanujam, S. (ed) *Proc. 5th Int. Wheat Genet. Symp.* New Delhi, India pp. 332-337.
- Doré, C., Cauderon, Y., Chueca, M.C. 1988. Inflorescence culture of *Triticum aestivum* × *Secale cereale* hybrids: production, characterization and cytogenetic analysis of regenerated plants. *Genome*, 30: 511-518.
- Doussinault, G., Delibes, A., Sanchez-Monge, R., Garcia-Olmedo, F. 1983. Transfer of a dominant gene for resistance to eyespot disease from a wild grass to hexaploid wheat. *Nature*, 303: 698-700.
- Dover, G.A. 1973. The genetics and interactions of 'A' and 'B' chromosomes controlling meiotic chromosome pairing in the *Triticinae*. *Proc. 4th Int. Wheat Gen. Symp.* Columbia, MO. pp. 653-667.
- Driscoll, C. J. 1974. Wheat- *Triticum kotschy* (*Aegilops variabilis*) (2n=28) addition lines. *European Wheat Aneuploid Newsletter*, 4: p. 60.

- Driscoll, C.J., Jensen, N.F. 1963. A genetic method for detecting induced intergeneric translocations. *Genetics*, 48: 459-468.
- Driscoll, C.J., Jensen, N.F. 1964. Characteristic of leaf-rust resistance transferred from rye to wheat. *Crop Sci.*, 4: 372-374.
- Driscoll, C.J., Sears, E.R. 1971. Individual additions of the chromosomes of 'Imperial' rye to wheat. *Agron. Abstr.*, 1971: 6.
- Dudits, D., Heszky, L. 2003. Növényi biotechnológia és géntechnológia. *Agroinform Kiadó*, Budapest, pp 312.
- Dvorak, J. 1977. Transfer of leaf rust resistance from *Aegilops speltoides* to *Triticum aestivum*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 19: 133-141.
- Dvorak, J., Knott, D. R. 1980. Chromosome location of two leaf rust resistance genes transferred from *T.speltoides* to *T. aestivum*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 22: 281-289.
- Dvorak, J., Knott, D. R. 1990. Location of a *Triticum speltoides* chromosome segment conferring resistance to leaf rust in *Triticum aestivum*. *Genome*, 33: 892-897.
- Dvorak, J. 1998. Genome analysis in the *Triticum-Aegilops* alliance. In: Slinkard A.E. (ed.) *Proc. 9th Int. Wheat Genet. Symp.*, Saskatoon, Canada, 2-7 August, 1998. University Extension Press, University of Saskatchewan, pp 8-11.
- D. Nagy, E., Linc, G., Molnár-Láng, M. 1998. Új búza-rozs amfidiploid molekuláris genetikai elemzése C-sávozással és genomikus *in situ* hibridizációval (GISH). *Növénytermelés*, 3: 253-260.
- D. Nagy, E., Molnár-Láng, M. 2000. Frequency of pairing between the 1B/1R translocations and its respective homo(eo)logous in a wheat-rye hybrid as revealed by GISH. *Cereal Res. Comm.* 28: 41-48.
- D. Nagy, E., Molnár-Láng, M., Linc G., Láng, L. 2002. Identification of wheat-barley translocations by sequential GISH and two-colour FISH in combination with the use of genetically mapped barley SSR markers. *Genome*, 45: 1238 - 1247.
- D. Nagy, E., Eder, Ch., Molnár-Láng, M., Lelley, T. 2003. Genetic mapping of sequence specific PCR-based markers in the short arm of the 1BL.1RS wheat-rye translocation. *Euphytica*, 132: 243-250.
- D. Nagy, E., Lelley, T. 2003. Genetic and physical mapping of sequence-specific amplified polymorphic (SSAP) markers on the 1RS chromosome arm of rye in a wheat background. *Theor. Appl. Genet.*, 107: 1271-1277.
- Endo, T.R. 1979. Selective gametocidal action of a chromosome of *Aegilops cylindrica* in a cultivar of common wheat. *Wheat Inf. Serv.*, 50: 24-28.

- Endo, T.R. 1988. Induction of chromosomal structural changes by a chromosome of *Aegilops cylindrica* L. in common wheat. J. Hered., 79: 366-370.
- Endo, T.R. 1996. Allocation of a gametocidal chromosome of *Aegilops cylindrica* to wheat homoeologous group 2. Genes Genet. Syst., 71: 243-246.
- Endo, T.R., Gill, B.S. 1984. Somatic karyotype, heterochromatin distribution, and nature of chromosome differentiation in common wheat, *Triticum aestivum* L. em. Thell. Chromosoma, 89: 361-369.
- Endo, T.R., Gill, B.S. 1996. The deletion stocks of common wheat. J. Hered., 87: 295-307.
- Endo, T.R., Katayama, Y. 1978. Finding a selectively retained chromosome of *Aegilops caudata* L. in common wheat. Wheat Inf. Serv., 47-48: 32-35.
- Endo, T.R., Tsunewaki, K. 1975. Sterility of common wheat with *Aegilops triuncialis* cytoplasm. J. Hered., 66: 13-18.
- Evans, L.E., Jenkins, B.C. 1960. Individual *Secale cereale* chromosome additions to *Triticum aestivum* L. The addition of individual „Dakold” Fall rye chromosomes to „Kharkov” winter wheat and their subsequent identification. Can. J. Gen. Cytol., 2: 205-215.
- Falk, D.E., Kasha, K.J. 1981. Comparison of the crossability of rye (*Secale cereale*) and *Hordeum bulbosum* onto wheat (*Triticum aestivum*). Can. J. Genet. Cytol., 23: 81-88.
- Farshadfar, M., Molnár-Láng, M., Sutka, J. 1994. The crossability of different wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes with *Triticum timopheevi* Zhuk. under two types of conditions. Cereal Res. Comm., 22:15-20.
- Fedak, G. 1977. Increased homoeolous chromosome pairing in *Hordeum vulgare* × *Triticum aestivum* hybrids. Nature, 266: 529-530.
- Fedak, G. 1980. Production, morphology and meiosis of reciprocal barley-wheat hybrids. Can. J. Genet. Cytol., 22: 117-123.
- Fedak, G. 1983. Hybrids between *Hordeum pubiflorum* and *Triticum aestivum*. Barley Genet. Newsletter, 13: 59.
- Fedak, G. 1998. Procedures for transferring agronomic traits from alien species to crop plants. In: Slinkard A.E. (ed.) Proc. 9th Int. Wheat Genet. Symp., Saskatoon, Canada, 2-7 August, 1998. University Extension Press, University of Saskatchewan, pp 1-7.
- Fedak, G., Grainger, J. 1986. Chromosome instability in somaclones of a *Triticum aestivum* × *Hordeum vulgare* hybrid. Can. J. Genet. Cytol., 28: 618-623.
- Fedak, G., Jui, P.Y. 1982. Chromosomes of Chinese Spring wheat carrying genes for crossability with Betzes barley. Can. J. Genet. Cytol., 24: 227-233.

- Feldman, M. 1965. Fertility of interspecific F₁ hybrids and hybrid derivatives involving tetraploid species of *Aegilops* section *Pleionathera*. *Evolution*, 19: 562-568.
- Feldman, M. 1988. Cytogenetic and molecular approaches to alien gene transfer in wheat. In: Miller, T.E., Koebner, R.M.D. (eds) *Proc. 7th Int. Wheat Gen. Symp.*, Cambridge, pp 23-32.
- Feldman, M. 2001. The origin of cultivated wheat. In: Bonjean, A.P., Angus, W.J. (eds) *The World Wheat Book. A history of wheat breeding*. Lavoisier Tech. & Doc., Paris, pp 3-56.
- Feldman, M., Levy, A.A. 2003. Acceleration of genome evolution by allopolyploidy: wheat as a model. In: Pogna, N.F., Romano, M., Pogna, E.A., Galterio, G. (eds) *Proc. 10th Int. Wheat Gen. Symp.*, Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Roma, pp 11-16.
- Fernandez, J.A., Gonzalez, J.M., Jouve, N. 1985. Meiotic pairing of the amphiploid *Hordeum chilense* × *Triticum turgidum* conv. Durum studied by means of Giemsa C-banding technique. *Theor. Appl. Genet.*, 70: 85-91.
- Fernandez-Escobar, J., Martin, A. 1985. Morphology, cytology and fertility of a trigeneric hybrid from *Triticale* × *Tritordeum*. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 95: 311-318.
- Finch, R.A., Bennett, M.D. 1980. Meiotic and mitotic chromosome behaviour in new hybrids of *Hordeum* with *Triticum* and *Secale*. *Heredity*, 44: 201-209.
- Fransz, P.F., Alonso-Blanco, C., Liharska, T.B., Peeters, A.J.M., Zabel, P., de Jong, J.H. 1996. High resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibers. *Plant Journal*, 9: 421-430.
- Fransz, P.F., Armstrong, S., de Jong, J.H., Parnell, L.D., van Drunen, C., Dean, C., Zabel, P., Bisseling, T., Jones, G.H. 2000. Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: Structural organization of heterochromatic knob and centromere region. *Cell*, 100: 367-376.
- Friebe, B., Gill, B.S. 1994. C-band polymorphism and structural rearrangements detected in common wheat (*Triticum aestivum*). *Euphytica*, 78: 1-5.
- Friebe, B., Gill, B.S. 1996. Chromosome Banding and Genome Analysis in Diploid and Cultivated Polyploid Wheats. In: Jauhar, P.P. (ed) *Methods of genome analysis in plants*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp 39-60.
- Friebe, B., Heun, M., Bushuk, W. 1989. Cytological characterization, powdery mildew resistance and storage protein composition of tetraploid and hexaploid 1BL/1RS wheat-rye translocation lines. *Theor. Appl. Genet.*, 78: 425-432.

- Friebe, B., Jiang, J., Raupp, W.J., McIntosh, R.A. Gill, B.S. 1996a. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica*, 91: 59-87.
- Friebe, B., Jiang, J., Tuleen, N., Gill, B.S. 1995a. Standard karyotype of *Triticum umbellulatum* and the characterization of derived chromosome addition and translocation lines in common wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 150-156.
- Friebe, B., Kynast, R.G., Gill, B.S. 2000a. Gametocidal factor-induced structural rearrangements in rye chromosomes added to common wheat. *Chromosome Research*, 8: 501-511.
- Friebe, B., Larter, E.N. 1988. Identification of a complete set of isogenic wheat-rye D-genome substitution lines by means of Giemsa C-banding. *Theor. Appl. Genet.* 76: 473-479.
- Friebe, B., Qi, L.L., Nasuda, S., Zhang, P., Tuleen, N.A., Gill, B.S. 2000b. Development of a complete set of *Triticum aestivum*-*Aegilops speltoides* chromosome addition lines. *Theor. Appl. Genet.* 101: 51-58.
- Friebe, B., Tuleen, N.A., Badaeva, E.D., Gill, B.S. 1996b. Cytogenetic identification of *Triticum peregrinum* chromosomes added to common wheat. *Genome*, 39: 272-276.
- Friebe, B., Tuleen, N.A., Gill, B.S. 1995b. Standard karyotype of *Triticum searsii* and its relationship with other S-genome species and common wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 248-254.
- Friebe, B., Tuleen, N.A., Gill, B.S. 1999. Development and identification of a complete set of *Triticum aestivum* – *Aegilops geniculata* chromosomes addition lines. *Genome*, 42: 374-380.
- Friebe, B., Tuleen, N.A., Jiang, J., Gill, B.S. 1993. Standard karyotype of *Triticum longissimum* and its cytogenetic relationship with *Triticum aestivum*. *Genome*, 36: 731-742.
- Friebe, B., Zeller, F.J., Kunzmann, R. 1987. Transfer of the 1BL/1RS wheat-rye translocation from hexaploid bread wheat to tetraploid durum wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 74: 423-425.
- Gale, M .D., Miller, T.E. 1987. The introduction of alien genetic variation into wheat. In: Lupton, F.G.H. (ed.) *Wheat Breeding: Its scientific basis.*, Chapman and Hall, UK. pp 173-210.
- Galiba, G., Lángné Molnár, M., Sutka, J. 1986. Árpa (*Hordeum vulgare* L.) × búza (*Triticum aestivum* L.) hibrid *in vitro* szaporítása. *Növénytermelés*, 35: 481-485.

- Gall, J.G., Pardue, M.L. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 63: 378-383.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soyabean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50: 151-158.
- Gerlach, W.L. 1977. N-banded karyotypes of wheat species. *Chromosoma*, 62: 49-56.
- Gerlach, W.L. and Bedbrook, J.R. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.*, 7: 1869-1885.
- Gill, B.S., Browder, L.E., Hatchett, J.H., Harvey, T.L., Martin, T.J., Raupp, W.J., Sharma, H.C., Waines, J.G. 1983. Disease and insect resistance in wild wheats. In: Sakamoto, S. (ed) *Proc. 6th Int. Wheat Genet. Symp.*, Kyoto, Japan, pp. 785-792.
- Gill, B.S., Friebe B., Endo T.R. 1991. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome*, 34: 830-839.
- Gill, B.S., Kimber, G., 1974a. Giemsa C-banded karyotype of rye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71: 1247-1249.
- Gill, B.S., Kimber, G., 1974b. Giemsa C-banding and the evolution of wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71: 4086-4090.
- Gill, B.S., Sharma, H.C., Raupp, W.J., Browder, L.E., Hatchett, J.H., Harvey, T.L. 1985. Evaluation of *Aegilops* species for resistance to wheat powdery mildew, wheat leaf rust, Hessian fly and greenbug. *Plant Breeding*, 69: 314 - 316.
- Gill, B.S., Raupp, W.J., Sharma, H.C., Browder, L.E., Hatchett, J.H., Harvey, T.L., Moseman, J.G. 1986. Resistance in *Aegilops squarrosa* to wheat leaf rust, wheat powdery mildew, greenbug, and Hessian fly. *Plant Disease*, 70: 553 -556.
- Graner, A., Jahoor, A., Schondelmaier, J., Siedler, H., Pillen, K., Fischbeck, G., Wenzel, G., Herrmann, R.F. 1991. Construction of an RFLP map of barley. *Theor. Appl. Genet.*, 83: 250-256.
- Graner, A., Bauer, E., Kellermann, A., Kirchner, A., Muraya, J.K., Jahoor, A., Wenzel, G. 1993. Progress of RFLP-map construction in winter barley. *Barley Genet. Newslett.*, 23: 53-59.
- Graybosch R. A. 2001. Uneasy unions: Quality effects of rye chromatin transfers to wheat. *J Cereal Sci.*, 33: 3-16.
- Gupta, P.K., Fedak, G. 1985. Intergeneric hybrids between *Hordeum californicum* and *Triticum aestivum*. *J. Hered.* 76: 365-368.

- Gupta, S.K., Charpe, A., Koul, S., Prabhu, K.V., Haq, Q.M.R. 2005. Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*-derived leaf-rust resistance gene, Lr9, for marker assisted selection in bread wheat. *Genome*, 48: 823-830.
- Hadlaczky, GY., Belea, A. 1975. C-banding in wheat evolutionary. *Plant Sci. Lett.*, 4: 85-88.
- Harper, M.E., Saunders, G.F. 1981. Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by *in situ* hybridization. *Chromosoma*, 83: 431-439.
- Helguera, M., Khan, I.A., Kolmer, J., Lijavetzky, D., Zhong-qi, L., Dubcovsky, J. 2003. PCR assay for the Lr37-Yr17-Sr38 cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Science*, 43: 1839-1847.
- Hernandez, P., Barcelo, P., Lazzeri, P.A., Lörz, H., Martin, A., Bohanec, B. 2001. Agronomic performance of transgenic Tritordeum. Biotechnological approaches for utilisation of gametic cells. COST 824. Final Meeting, Bled, Slovenia, 1-5 July, 2000. pp 199-204.
- Hernandez, P., Laurie, D.A., Martin, A., Snape, J.W. 2002. Utility of barley and wheat simple sequence repeat (SSR) markers for genetic analysis of *Hordeum chilense* and tritordeum. *Theor. Appl. Genet.*, 104: 735-739.
- Heszky, L. 1972a. A new artificial hybrid of species from the genera *Festuca* and *Lolium* (*Festuca pratensis* Huds. \times *Lolium temulentum* L.). *Acta Agr. Acad. Sci. Hung.* 21: 363-368.
- Heszky, L. 1972b. Különböző *Lolium* és *Festuca* fajok tetraploid alakjainak, valamint hibridjeinek előállítása és vizsgálata. *Agrobotanika*, XIV: 71-76.
- Heun, M., Friebe, B., Bushuk, W. 1990. Chromosomal location of the powdery mildew resistance gene of Amigo wheat. *Phytopathology*, 80: 1129-1133.
- Hossain, M.A., Driscoll, C.J. 1983. Fertility compensation of Cornerstone male sterility of wheat by rye. *Genetics*, 104: 181-189.
- Hsam, S.L.K., Zeller, F.J. 1997. Evidence of allelism between genes *Pm8* and *Pm17* and chromosomal location of powdery mildew and leaf rust resistance genes in the common wheat cultivar 'Amigo'. *Plant Breeding*, 116: 119-122.
- Hsam, S.L.K., Mohler, V., Hartl, L., Wenzel, G., Zeller, F.J. 2000. Mapping of powdery mildew and leaf rust resistance genes on the wheat-rye translocated chromosome T1BL.1RS using molecular and biochemical markers. *Plant Breeding*, 119: 87-89.
- Iordansky, A.B., Zurabishvili, T.G., Badaev, N.S. 1978. Linear differentiation of cereal chromosomes. I. Common wheat and its supposed ancestors. *Theor. Appl. Genet.*, 51: 145-152.

- Islam, A.K.M.R. 1980. Identification of wheat-barley addition lines with N-banding of chromosomes. *Chromosoma*, 76: 365-373.
- Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W. 1980. Meiotic restitution in wheat-barley hybrids. *Chromosoma*, 79: 363-372.
- Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W. 1988. Induced pairing between wheat and barley chromosomes. In: Miller T.E. and Koebner. R.M.D. (eds) *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.*, Cambridge, England, pp 309-314.
- Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W. 1990. Incorporation of barley chromosomes into wheat. In Bajaj, Y.P.S. (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 13. Wheat. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 128-151.
- Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W. 1992a. Production of wheat-barley recombinant chromosomes through induced homoeologous pairing. 1. Isolation of recombinants involving barley arms 3HL and 6HL. *Theor. Appl. Genet.*, 83: 489-494.
- Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W. 1992b. Substituting ability of individual barley chromosomes for wheat chromosomes. 1. Substitutions involving barley chromosomes 1, 3 and 6. *Plant Breeding*, 109: 141-150.
- Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W. 1995. Substitution of barley chromosome 4 for group 4 homoeologous of wheat. In: Li, Z. S., Xin, Z.Y. (eds), *Proc. 8th Int. Wheat Gen. Symp.* Beijing, China, 20-25 July, 1993, China Agricultural Sciencetech Press, Beijing, China, pp.141-144.
- Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W. 2000. Isolation of a fertile wheat-barley addition line carrying the entire barley chromosome 1H. *Euphytica*, 111: 145-149.
- Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W., Sparrow, D.H.B. 1975. Addition of individual barley chromosomes to wheat. *Proc. 3rd Int. Barley Genetics Symp.* Garching, W.Germany, pp. 260-270.
- Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W., Sparrow, D.H.B. 1978. Production and characterization of wheat-barley addition lines. In: Ramanujam S. (ed) *Proc 5th Int. Wheat Genet. Symp.*, New Delhi, India, pp. 356-371.
- Islam, A.K.M.R., Shepherd, K.W., Sparrow, D.H.B. 1981. Isolation and characterization of euplasmic wheat-barley chromosome addition lines. *Heredity*, 46: 160-174.
- Jahier, J., Doussinault, G., Dosba, F., Bourgeois, E. 1979. Monosomic analysis of resistance to eyespot in the variety 'Roazon'. In: Ramanujam S. (ed) *Proc. 5th Int. Wheat Genet. Symp.*, New Delhi, India, pp 437-440.

- Jauhar, P.P. 1995. Morphological and cytological characteristics of some wheat \times barley hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 872-877.
- Jauhar, P.P., Chibbar, R.N. 1999. Chromosome-mediated and direct gene transfers in wheat. *Genome*, 42: 570-583.
- Jensen, J., and Linde-Laursen, I. 1992. Statistical evaluation of length measurements on barley chromosomes with a proposal for new nomenclature for symbols and positions of cytological markers. *Hereditas*, 117: 51-59.
- Jiang, J., Dajun, L. 1987. New *Hordeum – Triticum* hybrids. *Cereal Res. Commun.*, 15: 95-99.
- Jiang, J., Gill, B.S. 1994. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome*, 37: 717-725.
- Jiang, J., Friebe, B., Gill, B.S. 1994. Chromosome painting of Amigo wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 811-813.
- de Jong, J.H., Fransz, P., Zabel, P. 1999. High resolution FISH in plants – techniques and applications. *Trends in Plant Science*, 4: 258-263.
- Junming, L., Mei, Z., Tishu, C. 1985. Somaclonal variation in intergeneric hybrids of *Hordeum vulgare* \times *Triticum aestivum*. *Acta Genet. Sin.*, 12: 434-439.
- Kakeda, K., Fukui, K., Yamagata, H. 1991. Heterochromatic differentiation in barley chromosomes revealed by C- and N-banding techniques. *Theor. Appl. Genet.*, 81: 144-150.
- Katterman, G. 1937. Zur Cytologie halmbehaarter Stämme aus Weizenroggenbastardierung. *Züchter*, 9: 196-199.
- Kerber, E. R., Dyck, P. L. 1990. Transfer to hexaploid wheat of linked genes for adult-plant leaf rust and seedling stem rust resistance from an amphiploid of *Aegilops speltoides* \times *Triticum monococcum*. *Genome*, 33: 530-537.
- Kertész, Z., Matúz, J., Pauk, J., Mesterházy Á., Papp, M., Cseuz, L., Csősz, M. 1997. Traditional and novel wheat breeding methods used in Hungary. In: Braun, H.J., Altay, F., Kronstad, W.E. Beniwal, S.P.S., McNab, A. (eds). *Wheat: prospects for global improvement*. Proc. 5th Int. Wheat Conference, Ankara, 10-14 June 1996. Turkey, pp 37-45.
- Kihara, H. 1924. Cytologische und genetische Studien bei wichtigen Getreidearten mit besonderer Rücksicht auf des Verhalten de Chromosomen und die Sterilität in den Bastarden. *Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Ser. B* 1, pp 200.

- Kimber, G. 1967. The addition of the chromosomes of *Aegilops umbellulata* to *Triticum aestivum* (var. Chinese Spring). Gen. Res. Camb., 9: 111-114.
- Kimber, G., Sallee, P.J. 1976. A hybrid between *Triticum timopheevii* and *Hordeum bogdanii*. Cereal Res. Commun., 4: 33-37.
- Kimber, G., Sears, E.R. 1983. Assignment of genome symbols in the *Triticeae*. In: Sakamoto, S. (ed) Proc. 6th Int. Wheat Genet. Symp., Kyoto, Japan, pp. 1195-1196.
- King, I.P., Reader, S.M., Purdie, K.A., Orford, S.E., Miller, T.E. 1994. A study of the effect of a homoeologous pairing promoter on chromosome pairing in wheat/rye hybrids using genomic *in situ* hybridization. Heredity, 72: 318-321.
- Kiss, Á. 1968. Triticale, a homok új gabonája. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. pp 179.
- Kiss, Á., Rédei, GY. 1952. Kísérletek búza-rozs hibridek (Triticale) előállítására. Növénytermelés, 1: 67-84.
- Koba, T., Handa, T., Shimada, T. 1991. Efficient production of wheat-barley hybrids and preferential elimination of barley chromosomes. Theor. Appl. Genet., 81: 285-292.
- Koba, T., Shimada, T., Otani, M., Niizeki, H. 1988. Chromosomal and morphological variation in plants regenerated from calli of immature embryos and inflorescences of a barley-wheat hybrid. In: Miller, T.E., Koebner, R.M.D. (eds) Proc. 7th Int. Wheat Gen. Symposium, Cambridge, England, pp 757-762.
- Koba, T., Takumi, S., Shimada, T. 1997. Isolation, identification and characterization of disomic and translocated barley chromosome addition lines of common wheat. Euphytica, 96:289-296.
- Koebner, R.M.D., Shepherd, K.W. 1986. Controlled introgression to wheat of genes from rye chromosome arm 1RS by induction of allosyndesis. 1. Isolation of recombinants. Theor. Appl. Genet., 73: 197-208.
- Koebner, R.M.D., Shepherd, K.W., Appels, R. 1986. Controlled introgression to wheat of genes from rye chromosome arm 1RS by induction of allosyndesis. 2. Characterisation of recombinants. Theor. Appl. Genet., 73: 209-217.
- Korzun, V., Malyshev, S., Voylokov, A.V., Börner, A. 2001. A genetic map of rye (*Secale cereale* L.) combining RFLP, isozyme, protein, microsatellite and gene loci. Theor. Appl. Genet., 102: 709-717.
- Kőszegi, B., Linc, G., Juhász, A., Láng, L., Molnár-Láng, M. 2000. Occurrence of the 1RS/1BL wheat-rye translocations in Hungarian wheat varieties. Acta Agr. Hungarica, 48: 227-236.

- Knott, D.R. 1961. The inheritance of rust resistance. VI. The transfer of stem rust resistance from *Agropyron elongatum* to common wheat. Can. J. Plant Sci., 41, 109-123.
- Kruse, A. 1973. *Hordeum* × *Triticum* hybrids. Hereditas 73: 157–161.
- Kubalakova, M., Valárik, M., Bartos, J., Vrana, J., Chalikova, J., Molnár-Láng, M., Dolezel, J. 2003. Flow cytometric analysis and sorting of rye (*Secale cereale* L.) chromosomes using flow cytometry. Genome, 46: 893-905.
- Künzel, G., Korzun, L. and Meister, A. 2000. Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. Genetics, 154: 397-412.
- Langer-Safer, P.R., Levine, M., Ward, D.C. 1982. Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 4381-4385.
- Lángné Molnár, M. 1992. Búza × árpa hibridek előállítása és citogenetikai elemzése. Kandidátusi értekezés. MTA, TMB, Budapest, pp 111.
- Lángné Molnár, M., Sutka, J., Barnabás, B., Sági, L., Belea, A. 1985. Árpa (*Hordeum vulgare* L.) × búza (*Triticum aestivum* L.) hibrid előállítása. Növénytermelés, 34: 257-262.
- Lángné Molnár, M., Sutka, J. 1989. Magyarországon termesztett búzafajták keresztezhetősége rozzsal. Növénytermelés, 38: 479-484.
- Lapitan, N.L.V., Sears, R.G., Gill, B.S. 1984. Translocations and other karyotypic structural changes in wheat × rye hybrids regenerated from tissue culture. Theor. Appl. Genet., 68: 546–554.
- Lapitan, N.L.V., Sears, R.G., Rayburn, A.L., Gill, B.S. 1986. Wheat-rye translocations. Detection of chromosome breakpoints by *in situ* hybridization with a biotin-labeled DNA probe. J.Hered., 77: 415-419.
- Lapitan, NLV, Ganai, MW, and Tanksley, SD 1989. Somatic. chromosome karyotype of tomato based on *in situ* hybridization. of the TGRI satellite repeat. Genome, 32: 992-998.
- Larkin, P.J., Scowcroft, W.R., 1981. Somaclonal variation - A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet., 60: 197-204.
- Le, H.T., Armstrong, K.C., Miki, B. 1989. Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. Plant Mol. Biol. Rep., 7: 150-158.
- Lein, A. 1943. Die genetische Grundlage der Kreuzbarkeit zwischen Weizen und Roggen. Zeitschr. indukt. Abstamm. und Vererb. Lehre, 81: 28-81.

- Leitch, I.J., and Heslop-Harrison, J.S. 1992. Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome*, 35: 1013-1018.
- Leitch, I.J., Heslop-Harrison, J.S. 1993. Physical mapping of four sites of 5S rDNA sequences and one site of the α -amylase-2 gene in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*, 36: 517-523.
- Leitch, A.R., Schwarzacher, T., Jackson, D., Leitch, I.J. 1994. *In situ* hybridization: a practical guide. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK, pp 118.
- Lelley J., Rajháthy T. 1955. A búza és nemesítése. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp 544.
- Lelley, T., Christoph, E., D.Nagy, E., Molnár-Láng, M. 1999. Az 1BL/1RS transzlokáció hatása a búzában, új genetikai variabilitás indukciója a transzlokációs kromoszómában. In: Veisz O (szerk.) Ötven éves a Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutatóintézete. Jubileumi Tudományos Ülés. MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár, 79-86.
- Li, J.Z., Sjakste, T.G., Röder, M.S., Ganai, M.W. 2003. Development and genetic mapping of 127 new microsatellite markers in barley. *Theor. Appl. Genet.*, 107: 1021-1027.
- Lima-Brito, J., Guedes Pinto, H., Harrison. G.E., Heslop-Harrison, J.S. 1996. Chromosome identification and nuclear architecture in triticales \times tritordeum F₁ hybrids. *Journal of Experimental Botany*, 47: 583-588.
- Linc, G., Friebe, B., Kynast, R.G., Molnár-Láng, M., Kőszegi, B., Sutka, J., B.Gill. 1999. Molecular cytogenetic analysis of *Aegilops cylindrica* Host. *Genome*, 42: 497-503.
- Linc, G., Lángné Molnár, M. 2003. Búza/árpa diszómás addíciók előállítása őszi búza-fajtákban kétféle módszerrel és azonosításuk molekuláris citogenetikai technikákkal. *Növénytermelés*, 52: 3-13.
- Linde-Laursen, I. 1975. Giemsa C-banding of the chromosomes of 'Emir' barley. *Hereditas*, 81: 285-289.
- Linde-Laursen, I., Doll, H., Nielsen, G. 1982. Giemsa C-banding patterns and some biochemical markers in a pedigree of European barley. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 88: 191-219.
- Linde-Laursen, I., Heslop-Harrison, J.S., Shepherd, K.W., Taketa, S. 1997. The barley genome and its relationship with the wheat genomes. A survey with internationally agreed recommendation for barley chromosome nomenclature. *Hereditas*, 126: 1-16.
- Logojan, A., Molnár-Láng, M. 2000. Production of *Triticum aestivum* – *Aegilops biuncialis* chromosome additions. *Cereal Res. Comm.*, 28, 221-228.

- Lowry, J.R., Sammons, D.J., Baenziger, P.S., Moseman, J.G. 1984. Identification and characterization of the gene conditioning powdery mildew resistance in 'Amigo' wheat. *Crop Sci.*, 24: 129-132.
- Löve, A. 1982. Generic evolution of the wheatgrasses. *Biol. Zentralbl.*, 101: 199-212.
- Löve, A. 1984. Conspectus of the *Triticeae*. *Feddes Repert*, 95: 425-521.
- Lukaszewski, A.J. 1990. Frequency of 1RS.1AL and 1RS.1BL translocations in United States wheats. *Crop Sci.*, 30: 1151-1153.
- Lukaszewski, A.J. 1993. Reconstruction in wheat of complete chromosomes 1B and 1R from the 1RS.1BL translocation of „Kavkaz” origin. *Genome*, 36: 821-824.
- Lukaszewski, A.J. 1995. Physical distribution of translocation breakpoints in homoeologous recombinants induced by the absence of the *Ph1* gene in wheat and triticales. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 714-719.
- Lukaszewski, A.J. 2000. Manipulation of the 1RS.1BL translocation in wheat by induced homoeologous recombination. *Crop Sci.*, 40: 216-225.
- Lukaszewski, A.J. 2001. Breeding behaviour of the cytogenetically engineered wheat-rye translocation chromosomes 1RS.1BL. *Crop Sci.*, 41: 1062-1065.
- Lukaszewski, A.J., Gustafson, J.P. 1983. Translocations and modifications of chromosomes in triticales \times wheat hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, 64: 239-248.
- Lukjanyenko, P.P. 1966. Metodi i rezultati szelekci ozimoy psenicu. In *Trudi Krasnodarszkogo NIISZH. Izd. Krasnodarszkoje knizsnoje izdatelstvo. Krasnodar, Vyp. 2*, 16-49.
- Ma, X.F., Wanous, M.K., Houchins, K., Rodriguez Milla, M.A., Goicoechea, P.G., Wang, Z., Xie, M., Gustafson, J.P. 2001. Molecular linkage mapping in rye (*Secale cereale* L.) *Theor. Appl. Genet.*, 102: 517-523.
- Maan, S.S. 1975. Exclusive preferential transmission of an alien chromosome in common wheat. *Crop Sci.*, 15: 287-292.
- MacKey, J. 1966. Species relationships in *Triticum*. *Proc. 2nd Int. Wheat Genet. Symp., Hereditas (Suppl.)*, 2: 237-276.
- Makkouk, K.M., Comeau, A., Ghulam, W. 1994. Resistance to barley yellow dwarf luteovirus in *Aegilops* species. *Canadian Journal of Plant Science*, 74: 631-634.
- Maluszynska, J., Heslop-Harrison. J. S. 1991. Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 1: 159- 166.

- Malysheva, L., Sjakste, T., Matzk, F., Röder, M., Ganai, M. 2003: Molecular cytogenetic analysis of wheat-barley hybrids using genomic *in situ* hybridization and barley microsatellite markers. *Genome*, 46: 314-322.
- Marais, G.F., Horn, M., Du Toit, F. 1994. Intergeneric transfer (rye to wheat) of a gene(s) for Russian wheat aphid resistance. *Plant Breeding*, 113: 265-271.
- Martin, A., Chapman, V. 1977. A hybrid between *Hordeum chilense* and *Triticum aestivum*. *Cereal Res. Commun.*, 5-4: 365-366.
- Martin, A., Cubero, J.I. 1981. The use of *Hordeum chilense* in cereal breeding. *Cereal Res. Commun.*, 9: 317-323.
- Martin, A., Rubiales, D., Rubio, J.M., Cabrera, A. 1995. Hybrids between *Hordeum vulgare* and tetra-, hexa-, and octoploid tritordeums (amphiploid *H. chilense* × *Triticum* ssp.). *Hereditas-Landskrona*. 123: 175-182.
- Martin, A., Sanchez-Monge Laguna, E. 1980. A hybrid between *Hordeum chilense* and *Triticum turgidum*. *Cereal Res. Commun.*, 8: 349-353.
- Martin, A., Sanchez-Monge Laguna, E. 1982. Cytology and morphology of the amphiploid *Hordeum chilense* × *Triticum turgidum* conv. durum. *Euphytica*, 31: 261-267.
- Merker, A. 1973. A Giemsa technique for rapid identification of chromosomes in triticales. *Hereditas*, 75: 280-282.
- Mettin, D., Blüthner, W.D., Schlegel, G. 1973. Additional evidence on spontaneous 1BL.1RS substitutions. In: *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.*, Columbia, USA, pp 179-184.
- Mettin, D., Schlegel, R., Blüthner, W.D., Weinrich, M. 1976. Giemsa-Banding von MI-Chromosomen bei Weizen-Roggen Bastarden. *Biol. Zentralbl.*, 95: 35-41.
- McFadden, E.S., Sears, E.R. 1946. The origin of *Triticum spelta* and its free-treshing hexaploid relatives. *J. Hered.*, 37, 107-116.
- McIntosh, R.A. 1988. Catalogue of gene symbols for wheat. In: Miller, T.E., Koeber, R.M.D. (eds) *Proc. 7th Int. Wheat Gen. Symp.*, Cambridge, pp 1225-1323.
- McIntosh, R.A. 1991. Alien sources of disease resistance in bread wheats. In: Sasakuma, T., Kinoshita, T., (eds) *Proc. Dr. H. Kihara Memorial Int. Symp. On Cytoplasmic Engineering in Wheat. Nuclear and organellar genomes of wheat species*. Yokohama, Japan, pp 320-332.
- Miller, T.E. 1983. Preferential transmission of alien chromosomes in wheat. In: Brandham, P.E., Bennett, M.D. (eds) *2nd Kew Chromosome Conference*. George Allen and Unwin, pp 173-182.

- Miller, T.E., Hutchinson, J., Chapman, V. 1982. Investigation of a preferentially transmitted *Aegilops sharonensis* chromosome in wheat. Theor. Appl. Genet., 61: 27-33.
- Miller, T.E., Reader, S.M., Chapman, V. 1981. The addition of *Hordeum chilense* chromosomes to wheat. Induced variability in plant breeding. In: Int. Symp. Eucarpia. Pudoc., Wageningen, pp 79-81.
- Miller, T.E., Reader, S.M., Ainsworth, C.C., Summers, R.W. 1987. The introduction of a major gene for resistance to powdery mildew of wheat, *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* from *Aegilops speltoides* into wheat, *T. aestivum*. In: Jorna, M.L., Sloodmaker, L.A.J. (eds.). Cereal Breeding Related to Integrated Cereal Production: Proc. Of the EUCARPIA Conference, Wageningen, The Netherlands, pp. 179-183.
- Miller, T.E., Reader, S.M., Purdie, K.A., King, I.P. 1994. Determination of the frequency of wheat-rye chromosome pairing in wheat \times rye hybrids with and without chromosome 5B. Theor. Appl. Genet., 98: 255-258.
- Miller, T.E., Riley, R. 1972. Meiotic chromosome pairing in wheat-rye combinations. Genet. Ibér., 24: 1-10.
- Molnár, I., Gáspár, L., Sárvári, É., Dulai, S., Hoffmann, B., Molnár-Láng, M., Galiba, G. 2004. Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. Functional Plant Biology, 31, 1149-1159.
- Molnár, I., Schneider, A., Molnár-Láng, M. 2005. Demonstration of *Aegilops biuncialis* chromosomes in a wheat background by genomic *in situ* hybridization (GISH) and identification of U chromosomes by FISH using GAA sequences. Cereal Res. Commun., 33: 673-680.
- Molnár, I., Linc, G., Molnár-Láng, M. 2006. Production and molecular cytogenetic analysis of 4H(4D) substitution line in a winter wheat background. (Plant Breeding folyóiratba bírálólat után javítva, visszaküldve)
- Molnár-Láng, M., Galiba, G., Kovács, G., Sutka, J. 1991. Changes in the fertility and meiotic behaviour of barley (*Hordeum vulgare*) \times wheat (*Triticum aestivum*) hybrids regenerated from tissue cultures. Genome, 34: 261-266.
- Molnár-Láng, M., Linc, G., Sutka, J. 1996. Transfer of the recessive crossability allele *kr1* from Chinese Spring into the winter wheat variety Martonvásári 9. Euphytica, 90: 301-305.

- Molnár-Láng, M., Linc, G., Friebe, B.R., Sutka, J. 2000a. Detection of wheat-barley translocations by genomic *in situ* hybridization in derivatives of hybrids multiplied *in vitro*. *Euphytica*, 112: 117-123.
- Molnár-Láng, M., Linc, G., Logojan, A., Sutka, J. 2000b. Production and meiotic pairing behaviour of new hybrids of winter wheat (*Triticum aestivum*) x winter barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*, 43: 1045-1054.
- Molnár-Láng, M., Linc, G., D. Nagy, E., Schneider, A., Molnár, I. 2002. Molecular cytogenetic analysis of wheat-alien hybrids and derivatives. *Acta Agr. Hung.*, 50: 303-311.
- Molnár-Láng, M., Novotny, C., Linc, G., D. Nagy, E. 2005. Changes in the meiotic pairing behaviour of a winter wheat-winter barley hybrid maintained for a long term in tissue culture, and tracing the barley chromatin in the progenies using GISH and SSR markers. *Plant Breeding*, 124: 247-252.
- Molnár-Láng, M., Sutka, J. 1994. The effect of temperature on seed set and embryo development in reciprocal crosses of wheat and barley. *Euphytica*, 78: 53-58.
- Molnár-Láng, M., Szakács, É. 2006. Development and molecular cytogenetic identification of new winter wheat 'Martonvásári 9 kr1'/winter barley 'Igri' disomic addition lines. In: Börner, A., Pankova, K., Snape, J.W. (eds) *Proc. 13th Int. EWAC Conference*, Prague, Czech Republic, *EWAC Newsletter*, 26-30.
- Molnár-Láng, M., Szakács, É., Linc, G., D.Nagy E. 2006. Production and molecular cytogenetic identification of new winter wheat /winter barley disomic addition lines. In *Proc. 7th Int. Wheat Conference*, Nov 27-Dec 2, Mar del Plata, Argentina (megjelenés alatt)
- Morris, R., Sears, E.R. 1967. The cytogenetics of wheat and its relatives. In: Quisenberry, K.S. (ed.), *Wheat and Wheat Improvement*. Agronomy Monograph No. 13, American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 19-87.
- Mujeeb-Kazi, A. 1981. Apomictic progeny derived from intergeneric *Hordeum-Triticum* hybrids. *J. Hered.*, 72: 284-285.
- Mujeeb-Kazi, A., Rodriguez, R. 1983. Meiotic instability in *Hordeum vulgare* × *Triticum aestivum* hybrids. *The Journal of Heredity*, 74: 292-296.
- Mukade, K., Kamio, M., Hosoda, K. 1970. The transfer of leaf rust resistance from rye to wheat by intergeneric addition and translocation. *Gamma Field Symp. No. 9. 'Mutagenesis in Relation to Ploidy level'*. pp 69-87.

- Mukai, Y., Endo, T.R., Gill, B.S. 1990. Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. *J. Hered.*, 81: 290-295.
- Mukai, Y., Endo, T.R., Gill, B.S. 1991a. Physical mapping of the 18S.26S rRNA multigene family in common wheat: identification of a new locus. *Chromosoma*, 100: 71-78.
- Mukai, Y., Friebe, B., Hatchett, J.H., Gill, B.S. 1991b. Detection of rye chromatin in wheat specifying resistance to Hessian fly by *in situ* hybridization using total rye genomes DNA probes. In: G. Kimber (ed) *Proc. 2nd Int. Symp. Chromosome Eng. in Plants*, Columbia, Missouri, USA. pp 184-188.
- Mukai, Y., Friebe, B., Hatchett, J.H., Yamamoto, M., Gill, B.S. 1993a. Molecular cytogenetic analysis of radiation induced wheat-rye terminal and intercalary chromosomal translocations and the detection of rye chromatin specifying resistance to Hessian fly. *Chromosoma*, 102 : 88-95.
- Mukai, Y., Nakahara, Y., Yamamoto, M. 1993b. Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridisation using total genomic and highly repetitive DNA probes. *Genome*, 36: 489-494.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Mustafaev, I.D., Piralov, G.R. 1980. Evolutionary and genetical aspects of the interrelations between wheat and *Ae. biuncialis* Vis. *Genetika*, 16: 1440-1446.
- Müntzing, A. 1939. Studies on the properties and the ways of production of rye-wheat amphidiploids. *Hereditas*, 25: 387-430.
- Natarajan, A.T., Sarma, N.P. 1974. Chromosome banding patterns and the origin of the B genome in wheat. *Genet. Res.*, 24: 103-108.
- O'Mara, J.G. 1940. Cytogenetic studies on *Triticeae*. I. A method for determining the effect of individual *Secale* chromosomes on *Triticum*. *Genetics*, 25: 401-408.
- Özgen, M. 1983. Hybrid seed set in wheat × *Aegilops* crosses. *Wheat Info. Serv.*, 56: 9-11.
- Özgen, M. 1984. Morphological characters and meiotic associations in a *T. aestivum* L. var. *erythroleucon* Körn. × *Ae. biuncialis* Vis. *Hybrid. Wheat Info. Serv.*, 58: 1-3.
- Park, C.H., Kumar, P.S., Walton, P.D. 1990. Plant regeneration and chromosomal stability in tissue cultures of the hybrids of *Elymus canadensis* with *Psathyrostachys juncea* and *Secale cereale*. *Plant Breeding*, 104: 184-189.
- Pauk, J., Gelencsér, E., Ács, E., Hajós, G., Mihály, R., Nagy, A., Kiss, E. 2003. Agronomical and biological evaluation of wide-range herbicide (*ppt*) resistant spring wheat (*Triticum aestivum* L.). In: Pogna, N.F., Romano, M., Pogna, E.A., Galterio, G. (eds)

- Proc. 10th Int. Wheat Genet. Symp., Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Roma, pp 193-196.
- Pauk, J., Hansch, R., Schwarz, G., Nerlich, A., Monostori, T., Mészáros, A., Jenes, B., Kertész, Z., Matuz, J., Schulze, J., Mendel, R.R. 1998. Transzgénikus búza (*Triticum aestivum* L.) előállítása Magyarországon. Növénytermelés, 47: 241-251.
- Pedersen, C., Langridge, P. 1997. Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. *Genome*, 40: 589-593.
- Pedersen, C., Rasmussen, S.K., Linde-Laursen, I. 1996. Genome and chromosome identification in cultivated barley and related species of the *Triticeae* (*Poaceae*) by *in situ* hybridization with the GAA-satellite sequence. *Genome*, 39: 93-104.
- Percival, J. 1921. The wheat plant. Duckworth Co., London., p 473.
- Pershina, L.A., Shumny, V.K. 1981. A characterization of clonal propagation of barley × rye and barley × wheat hybrids by means of tissue cultures. *Cereal Res. Commun.*, 9: 273-279.
- Pershina, L.A., Numerova, O.M., Belova, L.I., Devyatkina, E.P., Shumny, V.K. 1988. Fertility in barley × wheat hybrids *H. geniculatum* All. × *T. aestivum* L., their regenerants and hybrid progeny of backcrosses to *T. aestivum* L. *Cereal Res. Commun.*, 16: 157-163.
- Pestsova, E., Ganai, M.W., Röder, M.S. 2000. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome*, 43: 689-697.
- Pestsova, E.G., Börner, A., Röder, M.S. 2002. Development of wheat D-genome introgression lines assisted by microsatellite markers. *Proc. 4th Triticeae Symp.*, Cordoba, Italy, 207-210.
- Pickering, R.A., Hill, A.M., Kynast, R.G. 1997. Characterization by RFLP analysis and genomic *in situ* hybridization of a recombinant and a monosomic substitution plant derived from *Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L. crosses. *Genome*, 40: 195-200.
- Pickering, R., Klatte, S. and Butler, R.C. 2006. Identification of all chromosome arms and their involvement in meiotic homoeologous associations at metaphase I in 2 *Hordeum vulgare* L. × *Hordeum bulbosum* L. hybrids. *Genome*, 49: 73-78.
- Pietro, M.E., Tuleen, N.A., Hart, G.E. 1988. Development of wheat -*Triticum searsii* disomic chromosome addition lines. In: Miller, T.E., Koebner, R.M.D. (eds) *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.*, Cambridge, UK, pp 409-413.
- Purnhauser L., Gyulai, G., Csősz, M., Heszky, L., Mesterházy, Á. 2000. Identification of leaf rust resistance genes in common wheat by molecular markers. In: Barna, B., Király, Z.

- (eds) Proceedings of the 10th Cereal Rust and Powdery Mildew Conference, Budapest, Hungary, 2000. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hugarica*, 35: 31-37.
- Rabinovich, S.V. 1998. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. *Euphytica*, 100: 323-340
- Rajaram, S., Maan, C.E., Ortiz-Ferrara, A., Mujeeb-Kazi, A. 1983. Adaptation, stability and high yield potential of certain 1B/1R CIMMYT wheats. In: Sakamoto, S. (ed) Proc. 6th Int. Wheat Genet Symp., Kyoto, Japan, pp 613-621.
- Ramsay, L., Macaulay, M., degli Ivanissevich, S., MacLean, K., Cardle, L., Fuller, J., Edwards, K. J., Tuveson, S., Morgante, M., Massari, A., Maestri, E., Marmiroli, N., Sjakste, T., Ganai, M., Powell, W., Waugh, R. 2000. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics*, 156: 1997-2005.
- Raupp, J.W., Amri, A., Hatchett, J.H., Gill, B.S., Wilson, D.L., Cox, T.S. 1993. Chromosomal location of Hessian fly-resistance genes H22, H23, and H24 derived from *Triticum tauschii* in the D genome of wheat. *J.Hered.*, 84: 142-145.
- Raupp, J.W., Friebe, B., Wilson, D.L., Cox, T.S., Gill, B.S. 1997. Kansas State's Wheat Genetics Resource Center: provides unique oasis for germplasm research. *Diversity*, 13: 21-23.
- Raupp, J.W., Gill, B.S., Browder, L.E., Harvey, T.L., Hatchett, J.H., Wilson, D.L. 1988. Genetic diversity in wheat relatives for disease and insect resistance. In: Miller, T.E., Koebner, R.M.D. (eds) Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp., Cambridge, UK, pp 879-884.
- Raupp, J.W., Gill, B.S., Friebe, B., Wilson, D.L., Cox, T.S. Sears, R.G. 1995. The Wheat Genetics Resource Center: Germ plasm conservation, evaluation, and utilization. In: Li, Z. S., Xin, Z.Y. (eds), Proc. 8th Int. Wheat Genet. Symp., Beijing, China, pp 459-465.
- Rayburn, A.L., Gill, B.S. 1985. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *J. Hered.*, 76: 78-81.
- Rayburn, A.L., Gill, B.S. 1986a. Isolation of a D genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 4: 102-109.
- Rayburn, A.L., Gill, B.S. 1986b. Molecular identification of the D-genome chromosomes of wheat. *J. Hered.*, 77: 253-255.
- Reader, S.M., Abbo, S., Purdie, K.A., King, I.P., and Miller, T.E. 1994. Direct labelling of plant chromosomes by rapid *in situ* hybridization. *Trends Genet.*, 10: 265-266.

- Rédei, GY. 1955. *Triticum durum abyssinicum* × *Secale cereale* hibridek előállítására mesterséges embryo nevelés segítségével. Növénytermelés, 4: 365-367.
- Resta, P., Zhang, H.B., Dubcovsky, J., Dvorak, J. 1996. The origins of the genomes of *Triticum biunciale*, *T. ovatum*, *T. neglectum*, *T. columnare* and *T. rectum* (Poaceae) based on variation in repeated nucleotide sequences. Amer. J. Bot., 83: 1556-1565.
- Riley, R. 1968. The basic and applied genetics of chromosome pairing. Proc. 3rd Int. Wheat Gen. Symp., Canberra. pp 185-195.
- Riley, R., Chapman, V. 1958. Production and phenotypes of wheat-rye chromosome addition lines. Heredity, 12: 301-315.
- Riley, R., Chapman, V. 1967. The inheritance in wheat of crossability with rye. Genet. Res., Cambridge, 9: 259-267.
- Riley, R., Chapman, V., Johnson, R. 1968. Introduction of yellow rust resistance of *Aegilops comosa* into wheat by genetically induced homoeologous recombination. Nature, 217: 383-384.
- Riley, R., Kimber, G., Chapman, V. 1961. Origin of genetic control of diploid-like behaviour of polyploid wheat. J. Hered., 52: 22-25.
- Riley, R., Law, C.N. 1965. Genetic variation in chromosome pairing. Adv. Genet. 13: 57-114.
- Rimpau, W., 1891. Kreuzungsprodukte landwirtschaftl. Kulturpflanzen, Parey, Berlin. 1-39.
- Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P., Ganal, M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. Genetics, 149: 2007-2023.
- Salina, E.A., Leonova, I.N., Röder, M.S., Laikova, L.I., Maystrenko, O.I., Budashkina, E.B., Shumny, V.K. 2001. Wheat microsatellites: the prospects of application for gene mapping and analysis of reconstructed genomes. Russ. J. Physiol. 48: 377-381.
- Sarma, N.P., Natarajan, A.T. 1973. Identification of heterochromatic regions in the chromosomes of rye. Hereditas, 74: 233-237.
- Schachermayr, R., Siedler, H., Gale, M.D., Winzeler, H., Winzeler, M., Keller, B. 1994. Identification and localization of molecular markers linked to *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat. Theor. Appl. Genet., 88: 110-115.
- Schneider, A., 2001. Klasszikus és molekuláris citogenetikai vizsgálatok különböző gabonaféléken. Szakdolgozat, Veszprémi Egyetem, Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, Genetika és Növénynevelési Tanszék, Keszthely, pp 47.
- Schneider, A., Linc, G., Molnár-Láng, M. 2003. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) polymorphism with two repetitive DNA clones (pAs1, pSc119.2) in different wheat cultivars. Plant Breeding, 122: 396-400.

- Schneider, A., Linc, G., Molnár, I., Molnár-Láng, M. 2005. Molecular cytogenetic characterization of *Aegilops biuncialis* and its use for the identification of five derived wheat/*Aegilops biuncialis* addition lines. *Genome*, 48: 1070-1082.
- Schlegel, R., Korzun, V. 1997. About the origin of 1RS.1BL wheat-rye chromosome translocations from Germany. *Plant Breeding*, 116: 537-540.
- Schlegel, R., Weryszko, E. 1979. Intergeneric chromosome pairing in different wheat-rye hybrids revealed by the Giemsa banding technique and some implications on karyotype evolution in the genus *Secale*. *Biol. Zentralbl.*, 98: 399-407.
- Schlegel, R., Werner, T., Hülgenhof, E. 1991. Confirmation of a 4BL/5RL wheat-rye chromosome translocation line in the wheat cultivar 'Viking' showing high copper efficiency. *Plant Breeding*, 107: 226-234.
- Schubert, I., Shi, F., Fuchs, J., Endo, T.R. 1998. An efficient screening for terminal deletions and translocations of barley chromosomes added to common wheat. *The Plant Journal*, 14: 489-495.
- Schwarzacher, T., Leitch, A.R., Bennett, M.D., Heslop-Harrison, J.S. 1989. In-situ localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann. Bot. (London)*, 64: 315-324.
- Schwarzacher, T., Anamthawat-Jónsson, K., Harrison, G.E., Islam, A.K.M.R., Jia, J.Z., King, I.P., Leitch, A.R., Miller, T.E., Reader, S.M., Rogers, W.J., Shi, M. and Heslop-Harrison, J.S. 1992. Genomic *in situ* hybridization to identify alien chromosomes and chromosome segments in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 778-786.
- Seah, S., Bariana, H., Jahier, J., Sivasithamparam, K., Lagudah, E.S. 2001. The introgressed segment carrying rust resistance genes *Yr17*, *Lr37* and *Sr38* in wheat can be assayed by a cloned disease resistance gene-like sequence. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 600-605.
- Sears, E.R. 1952. Misdivision of univalents in common wheat. *Chromosoma*, 4: 535-550.
- Sears, E.R. 1956. The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat. *Brookhaven Symp. Biol.*, 9: 1-22.
- Sears, E.R. 1973. *Agropyron*-wheat transfers induced by homoeologous pairing. In: Sears, E.R., Sears L.M.S. (eds) *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.*, Univ. Of Missouri, Columbia, pp 191-199.
- Sears, E.R., 1977. An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Can. J. Genet. Cytol.*, 19: 585-593.
- Sears, E.R., 1984. Mutations in wheat that raise the level of meiotic chromosome pairing. In: Gustafson, J.P. (ed) *Gene manipulation in Plant Improvement*, Plenum Press, New York, pp 295-300.

- Sears, R.G., Deckard, E.L. 1982. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. *Crop Sci.* 22: 546-550.
- Sears, R.G., Hatchett, J.H., Cox, T.S., Gill, B.S. 1992. Registration of Hamlet, a Hessian fly resistant hard red winter wheat germplasm. *Crop Sci.*, 32: 506.
- Sears, E.R., Loegering, W.Q. 1982. Elimination of an undesirable trait from an alien translocation line by induced homoeologous pairing. In: Singh, R.B., R.M. Singh, B.D. Singh (eds) *Advances in Cytogenetics and Crop Improvement*. Kalyani Publishers, New Delhi, pp 81-86.
- Sebesta, E. E., Wood, E.A. 1978. Transfer of greenbug resistance from rye to wheat with X-rays. *Agron. Abstr.* p. 61-62.
- Serizawa, N., Nasuda, S., Shi, F., Endo, T.R., Prodanovic, S., Schubert, I., Künzel, G. 2001. Deletion-based physical mapping of barley chromosome 7H. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 827-834.
- Sethi, G.S., Finch, R.A., Miller, T.E. 1986. A bread wheat (*Triticum aestivum*) × cultivated barley (*Hordeum vulgare*) hybrid with homoeologous chromosome pairing. *Can. J. Genet. Cytol.*, 28: 777-782.
- Sharma, D., Knott, D.R. 1966. The transfer of leaf rust resistance from *Agropyron* to *Triticum* by irradiation. *Can. J. Genet. Cytol.*, 8: 137-143.
- Sharma, H.C., Gill, B.S., Sears, R.G. 1984. Inflorescence culture of wheat-*Agropyron* hybrids: Callus induction, plant regeneration, and potential in overcoming sterility barriers. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 3: 247-255.
- Sharp, P.J., Kris, M., Shewny, P.R., Gale, M.D. 1988. Location of β -amylase sequences in wheat and its relatives. *Theor Appl Genet.*, 75: 286-290.
- Shepherd, K.W., Islam, A.K.M.R. 1981. Wheat:barley hybrids - the first eighty years. In: Evans, L.T., Peacock, W.J. (eds) *Wheat science - today and tomorrow*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 107-128.
- Shepherd, K.W., Islam, A.K.M.R. 1988. Fourth compendium of wheat-alien chromosome lines. In: Miller, T.E., Koebner, R.M.D. (eds) *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.*, Cambridge, pp 1373- 1395.
- Sherman, J.D., Smith, L.Y., Blake, T.K. and Talbert, L.E. 2001. Identification of barley genome segments introgressed into wheat using PCR markers. *Genome*, 44: 38-44.
- Shewry, P.R., Parmar, S., Franklin, J., Burgess, S.R. 1990. Analysis of a rare recombination event within the multigenic *Hor 2* locus of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Genet. Res.*, 55: 171-176.

- Shimada, T., Koba, T., Otani, M., Niizeki, H. 1987. Morphology, meiosis and in vitro propagation of barley-wheat hybrids. Proc. 5th Int. Barley Genet. Symp., Okayama, pp 343-350.
- Shumny, V.K., Pershina, L.A. 1979. Production of barley-rye hybrids and their clonal propagation by the method of isolated tissue cultivation. Dokl. Acad. Nauk. SSSR, 249: 218-220.
- Shumny, V.K., Pershina, L.A., Belova, L.I. 1981. Production of barley x rye and barley x wheat hybrids. Cereal Res. Comm., 4: 265-272.
- Singh, N.K., Shepherd, K.W., McIntosh, R.A. 1990. Linkage mapping of genes for resistance to leaf, stem and stripe rusts and omega-secalins on the short arm of rye chromosome 1R. Theor. Appl. Genet., 80: 609-616.
- Singh, S., Franks, C.D., Huang, L., Brown-Guedira, G.L., Marshall, D.S., Gill, B.S., Fritz, A. 2004. *Lr41*, *Lr39*, and a leaf rust resistance gene from *Aegilops cylindrica* may be allelic and are located on wheat chromosome 2DS. Theor. Appl. Genet., 108: 586-591.
- van Slageren, M.W. 1994. Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. and Spach) Eig. (*Poaceae*). Joint publication of ICARDA and Wageningen Agricultural University, pp 512.
- Snape, J.W., Chapman, V., Moss, J., Blanchard, C.E., Miller, T.W. 1979. The crossabilities of wheat varieties with *Hordeum bulbosum*. Heredity, 42: 291-298.
- Stefanowska, G., Cauderon, Y. 1983. L'aptitude au croisement avec le seigle (*Secale cereale* L.) d'une lignée hexaploïde de *Triticum* (cv. Roazon) résultant d'hybridation interspécifique (*Gramineae* Juss.). Agronomie, 3: 358-359.
- Sumner, A.T., Evans, H.J., Buckland, R.A. 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. Nature New Biol., 232 31-32.
- Sutka, J. 2004. Növényi citogenetika. Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp 232.
- Surikov, J.M., Kissel, N.I. 1988. Mikroklonirovanie yachmenno-pshenichnikh gibridov. Dokl. Vasknil, 1: 2-4.
- Svitashev, S., Bryngelsson, T., Vershinin, A., Pedersen, C., Säll, T., Bothmer, R. von. 1994. Phylogenetic analysis of the genus *Hordeum* using repetitive DNA sequences. Theor. Appl. Genet., 89: 801-810.
- Szabó T. A. 2004. Az árpa rendszertani helye. In Tomcsányi A., Turcsányi, G. (szerk) Az árpa. Magyarország Kultúrflórája. Akadémiai Kiadó, Budapest. 23-39.

- Szakács, É., Linc, G., Láng, L., Molnár-Láng, M. 2004. Az 1A/1R búza/rozs transzlokáció kimutatása az új martonvásári búzafajtákban és fajtajelöltekben *in situ* hibridizációval. Növénytermelés, 53: 527-534.
- Taira, T., Larter, E.N. 1977. The effects of variation in ambient temperature alone and in combination with E-amino-n-caproic acid on development of embryos from wheat-rye crosses (*T. turgidum* var. *durum* cv. Jori \times *S. cereale*). Can. J. Bot., 55: 2335-2337.
- Takehisa, S., Utsumi, S., 1973. Visualization of metaphase heterochromatin in *Vicia faba* by the denaturation-renaturation Giemsa staining method. Experientia, 29: 120-121.
- Taketa, S., Kato, J., Takeda, K. 1995. High crossability of wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) with bread wheat and the differential elimination of barley chromosomes in the hybrids. Theor. Appl. Genet., 91: 1203-1209.
- Taketa, S., Takahashi, H., Takeda, K. 1998. Genetic variation in barley of crossability with wheat and its quantitative trait loci analysis. Euphytica, 103: 187-193.
- Taketa, S., Choda, M., Ohashi, R., Ichii, M., Takeda, K. 2002: Molecular and physical mapping of a barley gene on chromosome arm 1HL that causes sterility in hybrids with wheat. Genome, 45: 617-625.
- Ter Kuile, N., Nabors, M., Mujeeb-Kazi, A. 1988. Callus culture induced amphiploids of *Triticum aestivum* and *T. turgidum* \times *Aegilops variabilis* F₁ hybrids: Production, cytogenetics and practical significance. In: 80th Annu. Meet. Am. Soc. Agron. Abstr. 98.
- The, T.T., Gupta, R.B., Dyck, P.L., Appels, R., Hohmann, U., McIntosh, R.A. 1992. Characterization of stem rust-resistant derivatives of wheat cultivar Amigo. Euphytica, 58 : 245-252.
- Thomas, J.B., Mujeeb-Kazi, A., Rodriguez, R., Bates, L.S. 1977. Barley \times wheat hybrids. Cereal Res.Comm., 5: 181-188.
- Thomas, J.B., Kaltsikes, P.J., Anderson, R.G. 1980. Relation between wheat-rye crossability and seed set of common wheat after pollination with other species in the *Hordeae*. Euphytica, 30: 121-127.
- Tschermak, E.V., Bleier, H. 1926. Über fruchtbare *Aegilops*-Weizenbastarde. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 44: 110-131.
- Tsujimoto, H., Mukai, Y., Akagawa, K., Hagai, K., Fujigaki, J., Yamamoto, M. Sasakuma, T. 1997. Identification of individual barley chromosomes based on repetitive sequences: Conservative distribution of Afa-family repetitive sequences on the chromosomes of barley and wheat. Gen. Genet. Sys., 72: 303-309.

- Yamamoto, M., Mukai, Y., 2005. High-resolution physical mapping of the secalin-1 locus of rye on extended DNA fibers. *Cytogenet. Genome Res.*, 109: 79-82.
- Ya-Ping, Y., Xiao, C., Si-He, X., Islam, A.K.M.R., Zhi-Yong, X., 2003. Identification of wheat-barley 2H alien substitution lines. *Acta Botanica Sinica*, 45: 1096-1102.
- Valárik, M., Bartoš, J., Kovářová, P., Kubaláková, M., de Jong, J. H., Doležel, J. 2004. High-resolution FISH on super-stretched flow-sorted plant chromosomes. *Plant Journal*, 37: 940-950.
- Vasil, V., Vasil, I.K. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum* and *P. americanum* × *P. purpureum* hybrid. *Am. J. Bot.*, 68: 864-872.
- Villareal, R.L., Rajaram, S., Mujeeb-Kazi, A., Del-Toro, E. 1991. The effect of chromosome 1B/1R translocation on the yield potential of certain spring wheats (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breeding*, 106: 77-81.
- Villareal, R.L., Banuelos, O., Mujeeb-Kazi, A., Rajaram, S. 1998. Agronomic performance of chromosomes 1B and T1BL.1RS near-isolines in the spring bread wheat Seri M82. *Euphytica*, 103: 195-202.
- Vosa, C.G. 1974. The basic karyotype of rye (*Secale cereale*) analyzed with Giemsa and fluorescence methods. *Heredity*, 33: 403-408.
- Vosa, C.G., Marchi, P. 1972. Quinacrine fluorescence and Giemsa staining in plants. *Nature New Biol.*, 237: 191-192.
- Vrána, J., Kubaláková, M., Simková, H., Cíhalíková, J., Lysák, M.A., Dolezel, J. 2000. Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics*, 156: 2033-2041.
- Weimark, A. 1974. Elimination of wheat and rye chromosomes in a strain of octoploid triticale as revealed by Giemsa banding technique. *Hereditas*, 77: 281-286.
- Wells, D.G., Wong, R., Sze-Chung, Lay, C.L., Gardner, W.A.S., Buchenau, G.W. 1973. Registration of C.I. 15092 and C.I. 15093 wheat germ plasm. *Crop Sci.*, 13: 776.
- Weng, Y., Li, W., Devkota, R.N., Rudd, J.C. 2005. Microsatellite markers associated with two *Aegilops tauschii*-derived greenbug resistance loci in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 110: 462-469.
- Wettstein-Knowles, P. von 1990. Barley (*Hordeum vulgare*) 2n = 14. In: O'Brien S.J. (ed) Genetic maps. Cold Spring Harbor Lab Press, New York. pp. 6125-6135.
- Wienhues, A. 1965. Cytogenetische Untersuchungen über die chromosomale Grundlage der Rostresistenz der Weizensorte Weique. *Züchter*, 35: 352-354.

- Wilson, A.S. 1876. Wheat and rye hybrids. Trans and Proc. Bot. Soc. Edinburgh, 12: 286-288.
- Wojciechowska, B. 1985. Hybrids between *Hordeum vulgare* L. and *Triticum aestivum* L. Genetica Polonica, 26: 457-462.
- Wojciechowska, B., Pudelska, H. 1993. Hybrids from reciprocal barley-wheat crosses. Gen. Polonica, 34: 1-13.
- Wood, E.A. Jr., Sebesta, E.E., Stark, K.J. 1974. Resistance of 'Gaucho' triticales to *Schizaphis graminum*. Environ. Entomol., 3: 720-721.
- Zeller, F.J., Fischbeck, G. 1971. Cytologische Untersuchungen zur Identifizierung des Fremdchromosoms in der Weizensorte 'zorba' (W 565). Z. Pflanzenzüchtg. 66: 260-265.
- Zeller, J.F., Hsam, S.L.K. 1983. Broadening the genetic variability of cultivated wheat by utilizing rye chromatin. In: Sakamoto, S. (ed) Proc. 6th Int. Wheat Gen. Symposium, Kyoto, Japan, pp 161-173.
- Zeller, F.J., Koller, O.L. 1981. Identification of a 4A/7R and a 7B/4R wheat-rye chromosome translocation. Theor. Appl. Genet., 59: 33-37.
- Zeven, A.C. 1987. Crossability percentages of some 1400 bread wheat varieties and lines with rye. Euphytica, 36: 299-319.
- Zurabishvili, T.G., Iordansky, A.B., Badaev, N.S. 1974. Polykaryogram analysis and the investigation of differential staining of *Triticum aestivum* chromosomes. Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 218: 207-210.